



**Etablierung von zellulären Testsystemen für die Identifizierung von
neuartigen Inhibitoren des HIV-1 Vif-induzierten APOBEC3G-Abbaus**

**Establishment of cellular test systems for the identification of novel
inhibitors of the HIV-1 Vif-induced APOBEC3G-degradation**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Klasse: Infection and Immunity

vorgelegt von

Boris Nowotny

aus Prüm

Würzburg 2012

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: Prof. Dr. Axel Rethwilm

2. Betreuer: Dr. Gabriele Pradel

3. Betreuer: Prof. Dr. Kelly Chibale

4. Betreuer: Prof. Dr. Tanja Schirmeister

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “**Establishment of cellular test systems for the identification of novel inhibitors of the HIV-1 Vif-induced APOBEC3G- degradation**” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis. Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „**Etablierung von zellulären Testsystemen für die Identifizierung von neuartigen Inhibitoren des HIV-1 Vif-induzierten APOBEC3G-Abbaus**“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. HIV und AIDS.....	1
1.2. Das HI-Virus.....	2
1.2.1. Allgemeines.....	2
1.2.2. Virusaufbau und Replikation.....	3
1.2.3. Antivirale Therapie.....	6
1.3. Wirtsfaktoren und HIV-1.....	8
1.4. Die APOBEC-Proteinfamilie.....	9
1.5. APOBEC3-Cytidineaminase.....	10
1.5.1. Restriktion von HIV-1 durch APOBEC3G.....	11
1.5.2. Neutralisierung der antiviralen Aktivität von A3G durch Vif.....	14
1.5.3. Vif vermittelte proteasomale Degradation von A3G.....	15
1.5.4. Weitere von der A3G Restriktion unabhängige Funktionen von Vif.....	19
1.5.5. Die Vif vermittelte A3G Neutralisation als Ziel für antivirale Wirkstoffe.....	19
1.6. Identifizierung von Proteinabbauinhibitoren.....	21
1.7. Zielsetzung der Arbeit.....	23
2. Material	25
2.1. Relevante Gerätschaften.....	25
2.2. Chemikalien.....	25
2.3. Antikörper.....	26
2.4. Nukleinsäuren.....	26
2.4.1. Synthetische Oligonukleotide.....	26
2.4.2. Plasmide.....	28
2.5. Zellen.....	28
2.5.1. Prokaryontische Zellen.....	28
2.5.2. Eukaryontische Zellen.....	29
2.6. Enzyme.....	29
2.7. Antibiotika-Stammlösungen.....	29
2.8. DNA- und Proteingrößenstandards.....	30
2.9. Kits.....	30

2.10.	Puffer, Lösungen und Nährmedien	31
2.11.	Programme zur Datenauswertung	34
2.12.	Sonstige Materialien	34
3.	Methoden.....	35
3.1.	Molekularbiologische Methoden	35
3.1.1.	DNA-Amplifikation mittels PCR	35
3.1.2.	Kolonie-PCR.....	36
3.1.3.	Mutagenese-PCR	36
3.1.4.	DNA-Sequenzierung	38
3.1.5.	Hybridisierung von Oligonukleotiden	39
3.1.6.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	39
3.1.7.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	40
3.1.8.	Restriktion von DNA	40
3.1.9.	DNA-Dephosphorylierung	40
3.1.10.	Ligation von DNA-Fragmenten	41
3.1.11.	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	41
3.1.12.	DNA-Transformation	42
3.1.13.	Isolierung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab (Mini-Prep)	42
3.1.14.	Isolierung von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab (Maxi-Prep).....	43
3.1.15.	Photometrische DNA-Bestimmung	44
3.1.16.	Kryokonservierung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	44
3.1.17.	Ethanolpräzipitation von Plasmid-DNA	44
3.1.18.	Isolierung von genomischer DNA aus Mammalierzellen	44
3.2.	Zellbiologische Methoden	45
3.2.1.	Kultivierung adhärenter Mammalierzellen	45
3.2.2.	Kultivierung der stabilen Zelllinien	45
3.2.3.	Langzeitlagerung von Mammalierzellen	46
3.2.4.	Fixierung von Zellen für die Mikroskopie	46
3.2.5.	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	46
3.2.6.	Transiente Transfektion	47
3.2.7.	BiFC-Assay im 96-Well Format	47
3.2.8.	Herstellung der 293T ^{Vif TetOff/EYFP-A3G} -Zelllinie	48
3.2.9.	Herstellung der HeLa ^{DsREDmonomer TetOff} -Zelllinie	49

3.2.10. MTT-Assay	50
3.2.11. Substanzscreening	51
3.2.12. Substanzscreening im 96-Well Format	52
3.2.13. Arbeiten mit dem Multifluoreszenz-Assay	53
3.3. Virologische Methoden	53
3.3.1. Herstellung VSV-G pseudotypisierter retroviraler Vektoren	53
3.3.2. Herstellung viraler Partikel mit dem Drei-Plasmid-System	54
3.3.3. Aufkonzentrierung von Viruspartikeln mittels Ultrazentrifugation	55
3.3.4. Virustiterbestimmung	55
3.3.5. Test zum Nachweis der antiviralen Aktivität von A3G	56
3.4. Proteinbiochemische Methoden.....	57
3.4.1. Zellyse.....	57
3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	57
3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	58
3.4.4. Western-Blot.....	59
4. Ergebnisse	60
4.1. Etablierung der 293T ^{Vif TetOff/EYFP-A3G} -Zelllinie als A3G-Abbauassay	60
4.1.1. Darstellung der Expressionskonstrukte	62
4.1.2. Funktionalitätskontrolle der Expressionskonstrukte	63
4.1.2.1. Charakterisierung des EYFP-A3G Konstrukts	63
4.1.2.2. Charakterisierung des TetOff-Vif-Expressionssystems	67
4.1.3. Generierung und Charakterisierung der 293T ^{Vif TetOff/EYFP-A3G} -Zelllinie	68
4.1.3.1. Analysen zur Kinetik des EYFP-A3G Abbaus	72
4.1.3.2. Untersuchungen zum Proteasom vermittelten EYFP-A3G Abbau unter Verwendung spezifischer Inhibitoren des Proteasomsystems	74
4.1.3.3. Evaluierung der 293T ^{Vif TetOff/EYFP-A3G} -Zelllinie für die Substanzsuche im 96-Well Format.....	76
4.2. Entwicklung von Testsystemen zum Ausschluss falsch positiv wirkender Substanzen	76
4.2.1. Generierung und Charakterisierung der HeLa ^{DsREDmonomerTetOff} -Zelllinie.....	77
4.2.2. Etablierung der 293T ^{ODD-SBFP2} -Zelllinie als Proteasomkontrollassay	79
4.3. Etablierung eines multifluoreszenten Screening-Assays	82
4.4. Etablierung eines auf der BiFC-Technik basierenden Testsystems zur quantitativen Analyse der Vif-ElonginC-Interaktion	85

4.4.1. Bestimmung der Spezifität des BiFC-Assay	86
4.4.2. Weitergehende Charakterisierung der Vif BiFC-Konstrukte	89
4.5. Substanzscreening	92
4.5.1. Analyse von RN-18 Derivaten	92
4.5.2. RN-18 hemmt die TetOff-regulierte Genexpression	94
4.5.3. RN-18 wirkt cytotoxisch	96
4.5.4. Analyse von RN-18 mit dem Multifluoreszenz-Assay	97
4.5.5. Analyse von niedermolekularen Vif-ElonginC-Interaktionsinhibitoren	98
5. Diskussion	102
5.1. Etablierung einer A3G/Vif doppelstabilen Zelllinien als Testsystem für die Identifizierung von neuartigen A3G-Abbauinhibitoren	102
5.2. Etablierung von Kontrollassays zur Detektion falsch positiv wirkender Substanzen	106
5.3. Etablierung eines auf der BiFC-Technik basierenden Systems zur Identifizierung von Inhibitoren der Vif-ElonginC-Interaktion	108
5.4. Analyse von RN-18 Derivaten	111
5.5. Analyse von Inhibitoren der Vif- ElonginC-Interaktion	112
5.6. Schlussbemerkung und Ausblick	114
6. Zusammenfassung	117
7. Summary	119
8. Literatur	120
9. Abkürzungen	143
10. Veröffentlichungen	147
11. Danksagung	148
12. Anhang	149
12.1. Analyseergebnisse der Vif-ElonginC-Interaktionsinhibitoren	149
12.2. DNA-Sequenzen	155
12.3. Lebenslauf	158

1. Einleitung

1.1. HIV und AIDS

Den letzten Schätzungen zufolge waren Ende 2010 etwa 34 Millionen Menschen weltweit mit dem HI-Virus infiziert (UNAIDS, 2011). Dies war eine Steigerung der Infizierten um 17% gegenüber der im Jahr 2009 publizierten Zahl. Im Gegensatz dazu kann sowohl bei der Zahl der Neuinfektion als auch bei den AIDS bedingten Todesfällen ein stetiger Rückgang verzeichnet werden. So sank die Zahl von Neuinfektionen von 3,2 Millionen im Jahr 2001 auf 2,7 Millionen Ende 2010. Die Rate der AIDS bedingten Todesfälle betrug 1,8 Millionen, was einer Reduktion von 20% gegenüber dem Jahr 2005 entspricht. Trotz des positiven Trends, der bei Neuinfektionen als auch bei der Todesrate zu verzeichnen ist, stellt HIV weiterhin eine große gesellschaftliche Bedrohung dar, gerade für Schwellen- und Entwicklungsländer in Subsahara-Afrika.

Erste Hinweise auf das erworbene Immundefizienzsyndrom (AIDS) gab ein CDC-Bericht aus dem Jahr 1981 (*Pneumocystis pneumonia*-Los Angeles. MMWR. Morbidity and mortality weekly report 1981 30, 250-252). In diesem wurde von fünf jungen Männern berichtet, die an einer durch *Pneumocystis jirovecii* verursachten Pneumocystispneumonie (PCP) litten, einer Erkrankung die in der Regel nur in Verbindung mit einem supprimierten Immunsystem auftritt.

Einige Zeit nach den ersten dokumentierten AIDS Fällen konnte mit dem humanen Immundefizienzvirus vom Typ 1 (HIV-1), anfänglich als humanes T-lymphotropes Virus 3 (HTLV-3) oder lymphadenopathy-assoziiertes Virus (LAV) bezeichnet, und dem Immundefizienzvirus vom Typ 2 (HIV-2), vormals LAVII, die ursächlichen Erreger für die Immunschwächekrankheit identifiziert werden (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983; Popovic et al., 1983; Clavel et al., 1986).

Der hauptsächliche Übertragungsweg für das HI-Virus in der westlichen Welt ist heutzutage der ungeschützte Geschlechtsverkehr. Eine Transmission des HI-Virus durch intravenösen Drogenkonsum oder durch eine Mutter-zu-Kind Übertragung ist von nachrangiger Bedeutung (Forsman und Weiss, 2008).

Eine HIV-Infektion wird allgemein in drei Phasen unterteilt: Die akute Phase, die chronische Phase und AIDS (Flint et al., 2009). Die akute Phase schließt unmittelbar an die primäre Infektion an und erstreckt sich über einen Zeitraum von 4-8 Wochen. In den ersten zwei Woche nach der HIV-Exposition treten häufig Schwellungen der Lymphknoten

(Lymphadenopathy) oder Grippe-ähnliche Erkrankungen auf. Innerhalb der ersten Hälfte der akuten Phase kommt es zu einem massiven Anstieg der Viruslast, die einen Maximalwert von 1×10^7 viralen RNA Kopien pro mL Plasma erreichen kann, um dann in der zweiten Hälfte wieder stark abzunehmen (Sierra et al., 2004). Im gleichen Zeitraum ist eine deutliche Reduktion an zirkulierenden CD4 positiven T-Zellen zu verzeichnen, deren Zahl gegen Ende der akuten Phase wieder ansteigt, dabei allerdings nur selten wieder den Ausgangswert von ca. 1000 Zellen/ μ L erreicht (Flint et al. 2009).

Auf die akute Phase folgt eine chronische bzw. asymptomatische Phase. Diese ist hauptsächlich durch ein langsames, aber stetes Absinken der Konzentration an zirkulierenden CD4 positiven T-Zell bei gleichbleibender Viruslast im Blut charakterisiert. Die Höhe der Viruslast (viraler Setpoint) zu Beginn dieser Phase lässt eine Vorhersage über die Progression der HIV-Infektion zu (Langford et al., 2007). Generell gilt, je höher der virale Setpoint desto schneller entwickelt sich eine HIV-Infektion zum Krankheitsbild AIDS. Das Ende der chronischen Phase und der Beginn des Krankheitsbildes AIDS ist durch ein Abfallen der Konzentration an CD4 positiven T-Zell unter einen Wert von 200 Zellen/ μ L und einem gleichzeitig starken Anstieg der Viruslast gekennzeichnet (Forsman und Weiss, 2008; Flint et al., 2009). Klinisch ist AIDS im Wesentlichen durch das Auftreten von opportunistischen Infektionen der Haut, der Lunge, des Gastrointestinaltraktes sowie der Entstehung von Tumoren, wie beispielsweise dem Kaposi-Sarkom und malignen Lymphome gekennzeichnet.

Die zeitlichen Angaben, die hier zu den einzelnen Krankheitsphasen gemacht wurden beziehen sich auf sogenannte *Typical progressors*. Neben diesen können immer wieder Fälle beobachtet werden, bei denen die HIV-Infektion schneller (*rapid progressors*) oder langsamer (*slow progressors*) als normal voranschreitet. Etwa 2-5% der Infizierten in der westlichen Welt gehören zur Gruppe der sogenannten *long-term nonprogressors* (LTNPs). Obschon HIV-1 seropositiv, sind diese dazu in der Lage eine Infektionen mit dem HI-Virus durch noch nicht gänzlich aufgeklärte Mechanismen zu kontrollieren (Levy, 2009; Poropatich und Sullivan, 2011).

1.2. Das HI-Virus

1.2.1. Allgemeines

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) ist ein Lentivirus und gehört damit zur Familie der *Retroviridae*. Gemäß der Vorgaben des *International Committee on Taxonomy of Viruses* wird die Familie der *Retroviridae* in die Unterfamilien *Orthoretrovirinae* und *Spumaretrovirinae*

unterteilt. Zur Unterfamilie der *Orthoretrovirinae* gehören mit den Lenti-, α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren insgesamt sechs Gattungen, wohingegen die Unterfamilie der *Spumaretrovirinae* nur eine Gattung, die Foamyviren aufweist. Retroviren können auf Grundlage ihrer Genomstruktur funktional noch in einfache und komplexe Retroviren eingeteilt werden, wobei HIV zu den komplexen Retroviren zählt (Coffin et al., 1997). Einfache Retroviren wie das Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV) und das Rous Sarkom Virus (RSV) kodieren nur für die gruppenspezifischen Antigene (Kapsid-, Nukleokapsid- und Matrix-Protein), Membranproteine, Protease, Integrase und Polymerase, wohingegen die komplexen Retroviren zusätzlich noch regulatorische und akzessorische Proteine exprimieren. Alle Retroviren sind durch einen einzigartigen Replikationsmechanismus charakterisiert, der im Wesentlichen in einem Umschreiben des in Form von RNA vorliegenden Virusgenoms in DNA und dessen stabiler Integration in das Wirtsgenom besteht, womit sich Retroviren von allen anderen Viren abgrenzen. Das Umschreiben der RNA in DNA wird durch ein Enzym mit der Bezeichnung Reverse Transkriptase (RT) katalysiert (Herschhorn und Hizi, 2010).

Das HI-Virus als der derzeit wichtigste Vertreter der Retroviren wird in den Typ 1 (HIV-1) und 2 (HIV-2) unterteilt. HIV-1 kann weiter in Gruppe M (main), N (non-M und non-O), O (outlier) sowie P und HIV-2 in acht Gruppen (A-H) unterteilt werden (Hemelaar, 2012). HI-Viren vom Typ 1 aus der Gruppe M sind weltweit für den Großteil aller HIV-Infektionen verantwortlich. Infektionen mit HIV-2 treten vorwiegend in West-Afrika auf und machen global nur etwa 5% der Fälle aus. Die geringere Verbreitung wird auf die im Vergleich zu HIV-1 wesentlich niedrigere Virulenz von HIV-2 zurückgeführt (Kanki et al., 1994; Marlink et al., 1994; Sekigawa et al., 1998; Gilbert et al., 2003; Jose et al., 2005).

1.2.2. Virusaufbau und Replikation

Das HIV-1 Partikel (siehe Abb. 1.1) misst einen Durchmesser von ca. 140 nm (Briggs et al., 2003) und ist von einer Hüllmembran umgeben, die sich von der Zellmembran der Wirtszelle ableitet (Palmer und Goldsmith, 1988). In diese sind virale Glykoproteinkomplexe, bestehend aus dem Transmembranglykoprotein gp41 und dem äußeren Glykoprotein gp120, eingebettet. Diese Glykoproteinkomplexe stellen den Kontakt des Virus mit der Wirtszelle her. Da das Viruspartikel durch Knospung (*Budding*) aus der infizierten Zelle freigesetzt wird, sind neben den viralen Proteinen noch Membranproteine der Wirtszelle, wie Histokompatibilitätsantigene der Klasse I und II, beta-2-Mikroglobulin sowie eine Reihe von CD-Antigenen (Gelderblom et

al., 1987; Ott, 2008) mit der Virushülle assoziiert. Die Innenseite der Virushülle wird durch das Matrixprotein (p17) ausgekleidet, welches über eine N-terminale Myrestilierung in der Hüllmembran verankert ist. Bei den Lentiviren befindet sich im Partikelinneren ein konisch geformtes Kapsid, das sich aus 1000-1500 Kopien des Kapsidproteins (p24) pro Kapsid zusammensetzt (Briggs et al., 2004). Über Link-Proteine (p6) ist das Kapsid mit der Virushülle verbunden. Im Inneren des Kapsids befindet sich das Virusgenom in Form von zwei RNA-Strängen, die mit Nukleokapsidproteinen (NC) komplexiert sind. Daneben beherbergt das Viruspartikel noch virale Bestandteile, wie Reverse Transkriptase, Integrase, Protease, akzessorische Proteine (Sierra et al., 2004) und eine Reihe von zellulären Proteinen, wie beispielsweise APOBEC3G (Sheehy et al., 2002), Lyric (Engeland et al., 2011) und Annexine (Chertova et al., 2006).

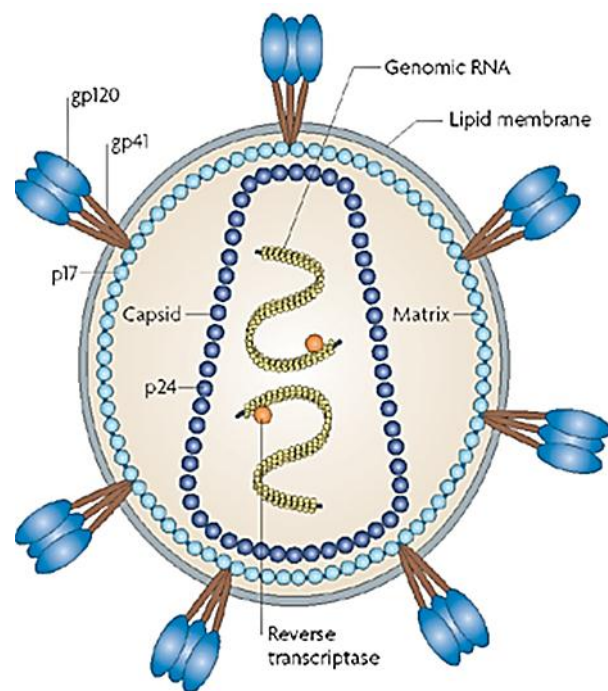


Abbildung 1.1: Aufbau eines HIV-1 Partikels (nach Karlsson et al. 2008)

Der Replikationszyklus von HIV-1 beginnt mit der Adsorption des Partikels an die Zielzelle. Dabei interagiert das externe Glykoprotein gp120 in einem primären Schritt mit dem zellulären Oberflächenrezeptor CD4, welcher in der Regel auf T-Helferzellen, Makrophagen und Monozyten exprimiert wird. Auf die CD4-Interaktion folgt eine Konformationsänderung, die es dem gp120 Glykoprotein ermöglicht mit einem der beiden Ko-Rezeptoren CCR5 oder CXCR4 in Wechselwirkung zu treten (Doms und Trono, 2000). In nachfolgenden Schritten

kommt es durch weitere Umlagerungen in der Proteinstruktur des Glykoproteinkomplexes sowie unter Mitwirkung des gp41 Transmembranproteins zu einer Fusion der Virushülle mit der Cytoplasmamembran der Zielzelle und zur Freisetzung des Kapsids in das Cytoplasma. Innerhalb der Zelle bildet sich der reverse Transkriptionskomplex aus, in dem ein durch die Reverse Transkriptase katalysiertes Umschreiben des viralen RNA Genoms in doppelsträngige DNA stattfindet. Das in DNA überführte Virusgenom bildet zusammen mit der viralen Intergrase (IN), dem Matrixprotein, dem akzessorischen Protein Vpr und zellulären Proteinfaktoren den Präintegrationskomplex (Miller et al., 1997; Marchand et al., 2006), der im Zusammenspiel mit zellulären Faktoren aktiv durch die Kernporen in den Kern transportiert wird (Bukrinsky et al., 1992; Woodward und Chow, 2010). Im Kern erfolgt der durch die Integrase vermittelte stabile Einbau der viralen DNA in das Wirtszellgenom (Delelis et al., 2008), wobei die Integration nicht völlig zufällig, sondern vorzugsweise in aktive Transkriptionseinheiten erfolgt (Bushman et al., 2005; Ciuffi, 2008). Die integrierte virale DNA, auch als Provirus bezeichnet, dient als Matrize für die Synthese des viralen RNA-Genoms und der viralen mRNAs, die für die zur Virusreplikation notwendigen Komponenten kodieren. In der frühen Phase der Virusreplikation können drei Klassen von mRNAs im Zellkern detektiert werden: mehrfach gespleißte, einfach gespleißte und ungespleißte mRNA-Moleküle.

Die mehrfach gespleißten mRNAs überwiegen in ihrer Zahl und kodieren für die HIV-1 Proteine Tat (*transactivator of transcription*), Rev (*regulator of expression of virions proteins*) und Nef (*negative factor*). Das Tat-Protein fungiert als Transaktivator der LTR-abhängigen Transkription der viralen Proteine und kontrolliert darüber hinaus die Transkription einiger zellulärer Gene (Romani et al., 2010). Rev ist ein posttranskriptionell wirkender Transaktivator, der an das RRE-Element (*rev responsive element*) in einfach gespleißten und ungespleißten viralen mRNAs bindet und deren Export aus dem Kern in das Cytoplasma reguliert (Flint et al., 2009). Nef führt eine Vielzahl von Funktionen aus. So konnte gezeigt werden, dass Nef die Expression der Oberflächenproteine CD3, CD4, CD28, MHC I und MHC II vermindert sowie die Virusreplikation und Virusinfektiosität positiv beeinflusst (Kirchhoff et al., 2008)

Einfach gespleißte RNAs kodieren für die Virusproteine Env, Vif, Vpu und Vpr, wohingegen die ungespleißten Spezies die Information für die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine tragen als auch die genomische RNA des Virus bilden. In der späten Phase der Virusreplikation werden die viralen Hüllprotein gp41 und gp120 als Vorläuferproteine (gp160) am Endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert und über den Golgi-Apparat zur

Plasmamembran transportiert. Während des Transportes wird gp160 durch die zelluläre Furin-Protease in gp120 und gp41 gespalten (Decroly et al., 1994; Pasquato et al., 2007). Die Synthese aller verbleibenden Virusproteine erfolgt an freien Ribosomen, die dann zusammen mit dem Virus-RNA-Genom zur Zellmembran transportiert werden, wo sie sich mit den Hüllproteinen zu einem neuen Partikel zusammenlagern, das durch Knospung (*Budding*) von der Zelle freigesetzt wird. Der letzte Schritt der Virusvermehrung besteht in der Reifung (*Maturation*) der Partikel zu infektiösen Viren. Dies geschieht durch eine durch die virale Protease vermittelte proteolytische Prozessierung der inkorporierten Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine und strukturellen Umlagerungen innerhalb des Viruspartikels (Sundquist und Kräusslich, 2012).

1.2.3. **Antivirale Therapie**

Seit Beginn der AIDS-Pandemie in den frühen achtziger Jahren konnten große Fortschritte bezüglich der Bekämpfung von HIV erzielt werden. Die Bekämpfungsstrategien konzentrieren sich in der Hauptsache auf die Infektionsvermeidung und die chemotherapeutische Behandlung (siehe Abb. 1.2) .

Gegenwärtig sind über 25 verschiedene antiretrovirale Wirkstoffe (ARVs) für die Behandlung von HIV-Infektionen zugelassen (De Clercq, 2010). Wegen Teils massiver Nebenwirkungen werden allerdings nicht alle Wirkstoffe für die Therapie eingesetzt. Die klinisch eingesetzten Therapeutika rekrutieren sich aus sechs Wirkstoffklassen, den Nukleosid basierten Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs), den Nicht-Nukleosid basierten Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs), den Proteaseinhibitoren (PIs), den Integraseinhibitoren (INIs) sowie den unter dem Oberbegriff Eintrittsinhibitoren zusammengefassten Fusionsinhibitoren (FIs) und Ko-Rezeptorinhibitoren (CRIs). Im Jahre 1985 wurde mit Zidovudin (AZT, 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine) der erste gegen HIV gerichtete Wirkstoff publiziert (Mitsuya et al., 1985) und zwei Jahre später durch die FDA für die Behandlung zugelassen. Die jüngsten Wirkstoffklassen bilden die Integraseinhibitoren und die Ko-Rezeptorinhibitoren. Letztere repräsentieren eine neue Generation von anti-HIV-Therapeutika, da sie durch Bindung an ein zelluläres Protein, die Virusreplikation hemmen (Latinovic et al., 2009). Es wird davon ausgegangen, dass die Entstehung einer Resistenz gegen diese Art der Wirkstoffe weniger wahrscheinlich ist als bei den übrigen ARVs, die ausnahmslos virale Proteine antagonisieren (Arts und Hazuda, 2012).

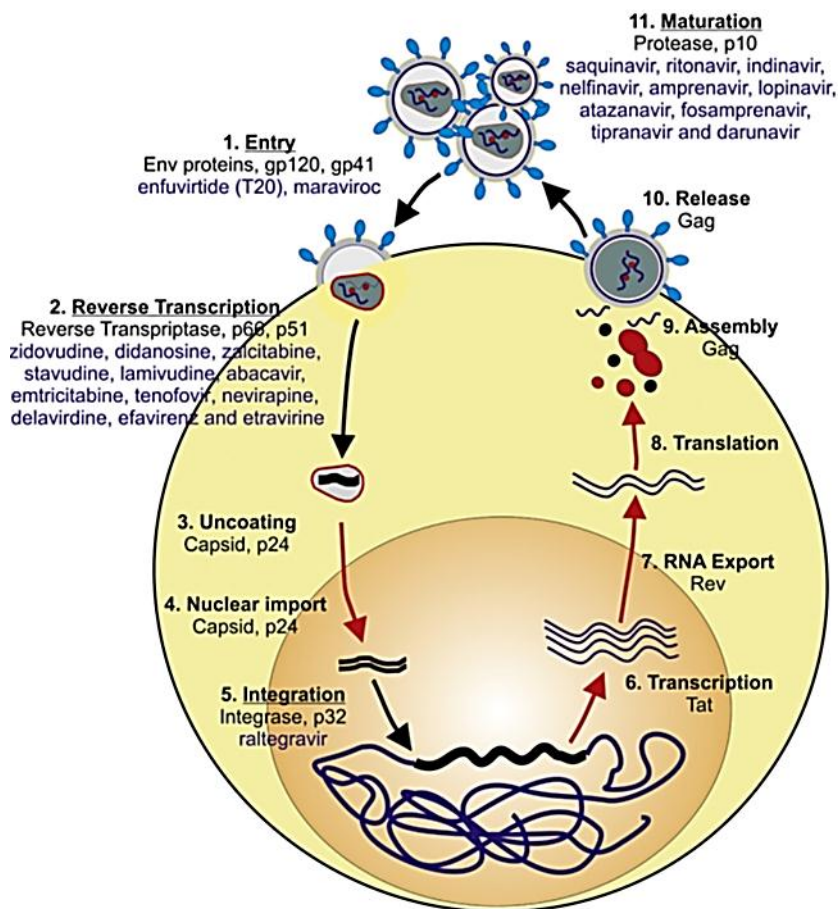


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung des Replikationszyklus von HIV-1 und Schritte, die durch antivirale Wirkstoffe inhibiert werden können (nach Arhel und Kirchhoff, 2010).

Ein weiterer Meilenstein bei der Bekämpfung von HIV war die Einführung der hoch aktiven anti-retroviralen Therapie (HAART) im Jahr 1996 (Collier et al., 1996; D'Aquila et al., 1996; Staszewski et al., 1996). HAART kombiniert die antivirale Wirkung von drei verschiedenen Therapeutika, meist zwei aus der Klasse der NRTIs und einem Proteaseinhibitor. Mit der kombinierten Gabe von verschiedenen antiretroviralen Wirkstoffen wurde es möglich, die Viruslast bis unter die Nachweisgrenze von < 50 RNA Kopien/mL zu senken (Arts und Hazuda, 2012).

Ein ernstzunehmendes Problem bei der chemotherapeutischen Langzeitbehandlung von HIV-Infizierten stellt das Auftreten und die Akkumulation von Wirkstoffresistenzmutationen dar, die dem Therapieerfolg entgegenstehen. Eine Gegenmaßnahme stellt die Optimierung der gegenwärtig eingesetzten Wirkstoffe dar. Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der HIV-Therapie besteht in der Identifizierung neuer Wirkstoff-Targets und der Entwicklung

entsprechender Wirkstoffe. Besonderes Interesse kommt dabei den Wirtsfaktoren zu, die in der Virusreplikation involviert sind.

1.3. Wirtsfaktoren und HIV-1

Die effiziente Vermehrung von HIV-1 bedingt ein kontrolliertes Zusammenspiel seiner Bestandteile mit einer Vielzahl von zellulären Faktoren. So ist beispielsweise für den effizienten Einbau des revers transkribierten HIV-Genoms die Interaktion der Integrase mit dem zellulären Ko-Faktor LEDGF/p75 erforderlich (Maertens et al., 2003; Llano et al., 2004). Die Funktion von LEDGF/p75 umfasst unter anderem die Blockierung des proteasomalen Abbaus der Integrase (Llano et al., 2006) als auch die Kontrolle, in welchen Regionen im Wirtsgenom die Integration der viralen DNA erfolgt (Ciuffi et al., 2005). Neben den zellulären Faktoren, die unterstützend auf die Virusvermehrung wirken exprimieren die Wirtszellen auch sogenannte Restriktionsfaktoren.

In den vergangenen Jahren sind eine Reihe von zellulären Proteinfaktoren identifiziert worden, die in der Lage sind, die Replikation von Retroviren als auch weiterer Virengruppen effizient zu hemmen. Die wichtigsten Vertreter dieser Restriktionsfaktoren sind Tetherin (auch als BST-1, CD317 oder HM1.24 bezeichnet), Trim5 α (tripartite motif 5 α) und APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G).

Tetherin, ein 30-36 kDa großes Typ II Transmembranprotein, hemmt die Virusreplikation durch Inhibition der Virusfreisetzung (Neil et al., 2008; Van Damme et al., 2008). Im Detail unterdrückt Tetherin die Partikelfreisetzung durch Immobilisierung der sich gebildeten Partikel auf der Oberfläche der infizierten Zelle (Yang et al., 2010). Strukturuntersuchungen offenbarten eine ungewöhnliche Proteintopologie für Tetherin, wobei der Faktor aus einem N- und C-terminalen Membrananker besteht, die durch eine coiled-coil Domäne miteinander verbunden sind. Während der Partikelbildung kann sich der C-terminale Membrananker in die Virushüllmembran einlagern, während die N-terminale Verankerungsdomäne in der Zellmembran verbleibt. Auf diese Weise kommt es zur Immobilisierung des Viruspartikels auf der Zelloberfläche. Als Gegenmaßnahme exprimiert HIV-1 das akzessorische Protein Vpu, das durch noch nicht gänzlich aufgeklärte Mechanismen die antivirale Funktion von Tetherin neutralisiert (Arias et al., 2011).

Trim5 α als ein weiterer antiretroviraler Proteinfaktor wurde 2004 identifiziert (Stremlau et al., 2004). Analysen ergaben, dass die durch Trim5 α vermittelte antiretrovirale Aktivität spezies-abhängig ist. So hemmt Trim5 α aus Rhesusmakaken effizient die Replikation

von HIV-1 durch die direkte Interaktion mit den Kapsidproteinen (p-24), während das humane Ortholog nur sehr geringe antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 zeigt (Nakayama und Shioda, 2012).

Als erster zellulärer Restriktionsfaktor wurde im Jahr 2002 APOBEC3G identifiziert (Sheehy et al., 2002). Zuvor war schon länger bekannt, dass Vif defizientes HIV-1 in Zelllinien wie HEK293T, HeLa, SupT1 und CEM-SS ungehindert repliziert während in anderen Zelllinien wie H9, HUT78 und CEM eine Hemmung der Virusvermehrung beobachtet wurde. Aufgrund ihrer Unfähigkeit bzw. Fähigkeit infektiöses Virus zu produzieren werden diese Zelllinie auch als nicht-permissiv bzw. permissiv bezeichnet. Im Rahmen einer cDNA-Substraktionsanalyse unter Verwendung von CEM und CEM-SS Zellen konnte mit APOBEC3G (vormals als CEM15 bezeichnet) die Ursache für den nicht-permissiven Phänotyp ermittelt werden. In nachfolgenden Studien wurde gezeigt, dass das akzessorische HIV-1 Protein Vif (*virion infectivity factor*) direkt mit APOBEC3G interagiert und dessen antiretrovirale Aktivität neutralisiert (Sheehy et al., 2003).

1.4. Die APOBEC-Proteinfamilie

Die Cytidineaminase APOBEC3G gehört zur APOBEC-Proteinfamilie. Nach dem gegenwärtigen Forschungsstand besteht die humane APOBEC-Proteinfamilie (siehe Abb. 1.3) aus insgesamt vier Unterfamilien (AID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3 und APOBEC4), wobei sich die APOBEC3 (A3) Unterfamilie aus weiteren 7 Mitgliedern (A3A, A3B, A3C, A3DE, A3F, A3G und A3H) zusammensetzt. Das gemeinsame Charakteristikum aller Mitglieder der APOBEC-Proteinfamilie ist das Vorhandensein von Cytidineaminase-Domänen, eine bei AID, APOBEC1, APOBEC2, A3C, A3H, APOBEC4 und zwei bei A3B, A3DE, A3F, A3G (Jarmuz et al., 2002; Conticello et al., 2005). Diese Domänen sind charakterisiert durch ein Zink koordinierendes Proteinmotiv mit der konservierten Konsensussequenz Histidin-Adenin/Valin-X-Glutamat-X₂₄₋₂₈-Prolin-Cystein-X₂₋₄-Cystein (X = beliebige Aminosäure), welche die Desaminierung von Cytosin zu Uracil in RNA oder einzelsträngiger DNA katalysieren (Jarmuz et al., 2002; Conticello et al., 2005). Genomisch lokalisiert sind die humanen APOBEC-Proteine AID und APOBEC1 auf Chromosom 12 (12p13), APOBEC2 auf Chromosom 6 (6p21), APOBEC4 auf Chromosom 1 (1p25.3) und die Mitglieder der APOBEC3 Unterfamilie als Gencluster auf Chromosom 22 (22q13.1).

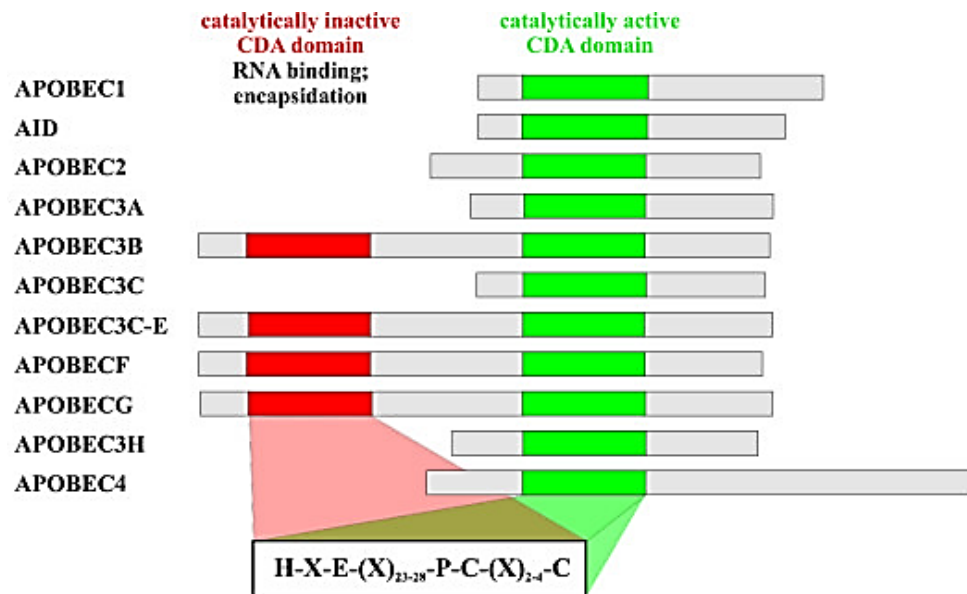


Abbildung 1.3: Topologie der APOBEC Proteine (nach Goila-Gaur und Strebel, 2008).

APOBEC1 spielt eine wichtige Rolle beim Lipidmetabolismus, indem es das Cytosin an Position 6666 in der Apolipoprotein B (apoB) mRNA zu Uracil desaminiert, was zur Bildung eines vorzeitigen Stoppcodons führt. Als Folge wird ein verkürztes Apolipoprotein B (apoB48) exprimiert (Blanc und Davidson, 2010). AID (*activation induced deaminase*) hingegen hat eine große Bedeutung für die Affinitätsreifung von Antikörpern als auch für den Isotypenwechsel von Immunglobulinen (Larijani und Martin, 2012).

Über die genaue Funktion von APOBEC2 und APOBEC4 ist bisher nur sehr wenig bekannt. APOBEC2 wird exklusiv in Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen exprimiert und scheint eine Rolle bei der Embryogenese zu spielen (Vonica et al., 2011). Die Expression von APOBEC4 ist auf den Hoden beschränkt, und es wird vermutet, dass APOBEC4 in der Spermatogenese involviert ist (Rogozin et al., 2005).

1.5. APOBEC3-Cytidineaminasen

Im Verlauf von weitergehenden Analysen zur antiviralen Aktivität der APOBEC3-Proteine zeigte sich, dass diese nicht nur in der Lage sind, die Vermehrung von HIV-1 zu hemmen, sondern zusätzlich auch die Mobilität von endogenen Retroelementen kontrollieren (Chiu und Greene, 2008; Koito und Ikeda, 2011). Retroelemente lassen sich in LTR-Retrotransposons (oder endogene Retroviren) und nicht-LTR-Retrotransposons eingruppiert, wobei letztere

Gruppe weiter in *long interspersed nuclear elements* (LINEs) und *short interspersed nuclear elements* (SINEs) untergliedert wird. LINE-1, als der wichtigste Vertreter der LINE Elemente belegt ungefähr 17% des humanen Genoms und seine unkontrollierte Transposition in Gene steht in Verbindung mit einer Reihe von schweren Erkrankungen, wie der Duchene Muskeldystrophie, beta-Thalassämie und der Entwicklung von Darmkrebs (Kinomoto et al., 2007). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von APOBEC3-Proteinen die Retrotransposition von LINE-1 hemmt, wobei A3A, A3B und A3F eine fast vollständigen Deaminase-abhängige Inhibition vermitteln (Muckenfuss et al., 2006; Wissing et al., 2011).

Die Funktion der APOBEC3 Proteine ist nicht nur auf die Restriktion von Lentiviren wie HIV-1 und mobile Retroelemente beschränkt. Vielmehr konnte eine Reihe von Studien belegen, dass beispielsweise APOBEC3G die Replikation weiterer Retroviren wie Foamyvirus (Russell et al., 2005; Delebecque et al., 2006), XMRV (Paprotka et al., 2010), HTLV (Sasada et al., 2005) und andere Virustypen wie HBV (Lei et al., 2006), MV, MuV, RSV (Fehrholz et al., 2012) hemmt.

1.5.1. Restriktion von HIV-1 durch APOBEC3G

Zusammen mit A3F hemmt A3G die Replikation von HIV-1 am effektivsten, während die anderen A3 Proteinen nur in geringem Maße zur Inhibition der Virusvermehrung beitragen. Die Hemmung der HIV-Replikation basiert in erster Linie auf einer Deaminase-katalysierten Hypermutation des viralen Genoms (Harris et al., 2003; Mangeat et al., 2003; Zhang et al., 2003). Im Detail wird A3G in Abwesenheit von Vif in sich bildende Viruspartikel spezifisch inkorporiert (siehe Abb. 1.4). Nach Eintritt der Partikel in die Zielzelle werden während der Reversen Transkription durch APOBEC3G Cytosinreste im neusynthetisierten DNA-Strang negativer Polarität durch hydrolytische Abspaltung der Aminogruppe an Basenposition C4 in Uracil umgesetzt (Suspène et al., 2004). Da Uracil komplementär zu Adenin ist, resultiert im Verlauf der DNA-Synthese aus der Desaminierung von Cytosin eine G zu A Mutation des viralen DNA-Genoms, wobei die Mutationen ungleichmäßig über das virale Genom verteilt sind. A3G desaminiert vorzugsweise das zweite Cytosin im 5'-CC Kontext, wohingegen APOBEC3F eine Präferenz für Cytosin in der 5'-TC Sequenz zeigt (Beale et al., 2004; Bishop et al., 2004; Suspène et al., 2004).

Als Konsequenz einer massiven Ansammlung von G zu A Mutationen im revers transkribierten HIV-Genom kommt es in der Regel zur Expression von nicht mehr

funktionellen Virusproteinen, zum Abbau der viralen DNA durch zelluläre DNA-Reparaturproteine und zu einer gestörten Integration des Virusgenoms (Chiu und Greene, 2009).

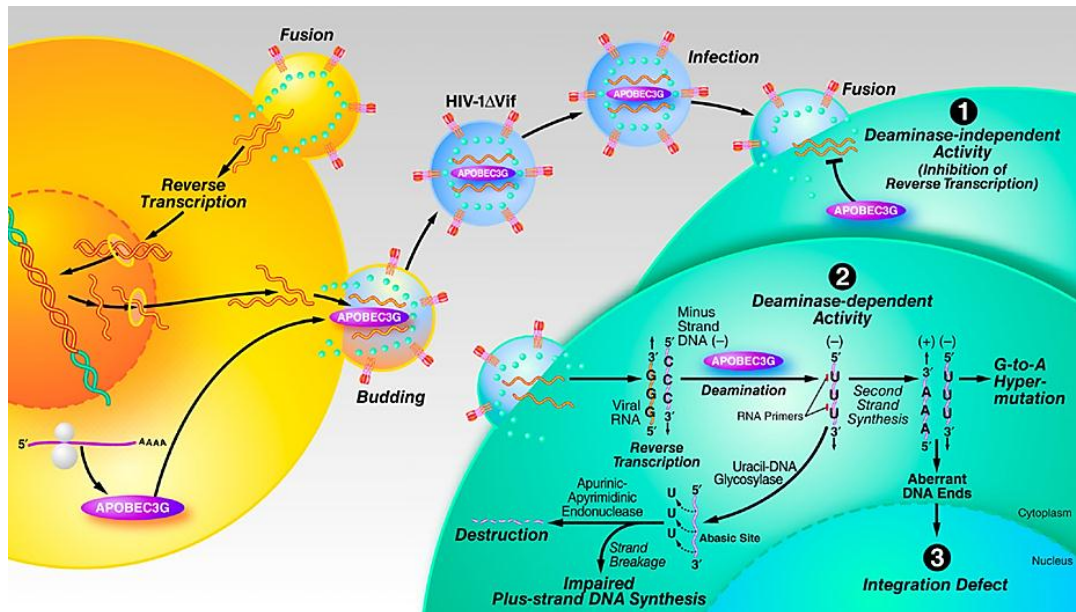


Abbildung 1.4: A3G vermittelte Restriktion von HIV in Abwesenheit von Vif. Beschreibung siehe Text. (Chiu und Greene, 2009)

Experimente mit APOBEC3G Mutanten haben gezeigt, dass nur die C-terminale Deaminasedomäne katalytisch aktiv ist (Haché et al., 2005; Schumacher et al., 2008) und dessen intrinsische Aktivität möglicherweise durch Phosphorylierung der Aminosäure Threonin an Position 218 reguliert wird (Demorest et al., 2011). Die enzymatisch inaktive N-terminale Deaminasedomäne scheint die Intensität der enzymatischen DNA-Editierung zu beeinflussen (Feng und Chelico, 2011). Weiterhin spielt die pseudoaktive N-terminale Deaminasedomäne und hier speziell die Zink-koordinierenden Aminosäuren His65, Cys97, Cys100 eine wichtige Rolle bei der Multimerisierung von APOBEC3G als auch bei dessen Inkorporation in das Viruspartikel. Ein Austausch von beispielsweise Cystein an Position 97 mit Alanin resultiert in einem dimerisierungsdefekten A3G Protein (Navarro et al., 2005; Opi et al, 2006). Neben den Zink koordinierenden Aminosäuren sind noch die Aminosäuren im Bereich von 124 bis 127 für die Multimerisierung und Verpackung von Belang (Huthoff und Malim, 2007; Huthoff et al., 2009). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die Dimerisierung von A3G durch eine direkte Interaktion mit RNA Molekülen vermittelt wird (Opi et al., 2006, Friew et al., 2009; Huthoff et al., 2009).

Ähnlich wie bei der Multimerisierung spielt die Fähigkeit von A3G, direkt mit RNA zu interagieren, eine Schlüsselrolle bei seiner Verpackung in HIV-1 Partikel. Als gesichert gilt, dass die Inkorporation von A3G durch die Interaktion mit Gag-Vorläuferprotein während der Partikelbildung erfolgt (Alce und Popik, 2004). Dabei bindet A3G die Nukleokapsiddomäne im Gag-Vorläuferprotein über eine RNA-Brücke (Cen et al., 2004; Luo et al., 2004; Schäfer et al., 2004; Burnett und Spearman, 2007; Friew et al., 2009). Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte allerdings noch nicht eindeutig geklärt werden, welche RNA-Spezies für die Verpackung von Relevanz ist. Neben der 7SL und hY RNA scheinen weitere zelluläre als auch virale RNAs als Kandidaten in Frage zu kommen (Svarovskaia et al., 2004; Kahn et al., 2005, 2007; Soros et al., 2007; Wang et al., 2007, Bach et al., 2008, Zhang et al., 2010).

Zellkulturversuche mit PBMC-Zellen als virusproduzierende Zellen haben ergeben, dass umgerechnet 7 (± 4) A3G-Moleküle pro Virenpartikel inkorporiert werden, und diese Menge ausreichend für eine effektive Hemmung von HIV-1 ist (Xu et al., 2007). Innerhalb der Partikel bildet A3G zusammen mit dem viralen RNA-Genom und den Proteinen NC, IN und Vpr einen Ribonukleoprotein-Komplex aus (Soros et al., 2007). Der direkte Kontakt mit der viralen RNA resultiert dabei in einer Hemmung der intrinsischen Deaminaseaktivität von A3G, die jedoch durch die RT-vermittelte RNaseH-Aktivität während des Reversen Transkriptionsprozesses wieder aufgehoben wird (Soros et al., 2007).

Innerhalb der Zelle ist A3G cytoplasmatisch lokalisiert. Die Lokalisation wird dabei durch die Aminosäuren im Bereich von 1-60 und 113-128 in der N-terminalen Proteindomäne gesteuert (Stenglein et al., 2008). Anhand eines auf der Kristallstruktur der C-terminalen Domäne von A3G (Chen et al., 2008) aufbauenden Strukturmodells konnte gezeigt werden, dass die genannten Sequenzbereiche räumlich eng orientiert sind und einen Cluster auf der Proteinoberfläche bilden (Stenglein et al., 2008).

In einigen Zelltypen ist A3G in zellulären Ribonukleoproteinkomplexen angereichert (Stopak et al., 2003; Chiu et al., 2005; Kozak et al. 2006; Kreisberg et al., 2006; Wichroski et al., 2006; Gallois-Montbrun et al., 2007, 2008). In CD4 T-Zellen kann A3G in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der Zellen in hochmolekularen (HMM) oder niedermolekularen Ribonukleoproteinkomplexen (LMM) angereichert sein. In Folge einer Aktivierung der T-Zelle durch endogene Faktoren kommt es zu einer Rekrutierung von A3G in 5–15 MDa große hochmolekulare Komplexe (Kreisberg et al. 2006; Stopak et al., 2007; Chiu und Greene, 2009). Die Form, in welcher A3G komplexiert vorliegt, scheint über dessen Funktion zu bestimmen. Im HMM-Komplex gebundenes A3G hemmt die Alu Retrotransposition, zeigt

aber keine antivirale Aktivität (Chiu et al., 2006, 2011). In Form von niedermolekularen Komplexen ist A3G dagegen in der Lage, die virale Replikation zu hemmen.

Wie mit katalytisch-inaktiven A3G-Mutanten gezeigt werden konnte, basiert die Restriktion der Virusreplikation zu einem gewissen Anteil auch auf Deaminase-unabhängigen Mechanismen (Chiu und Greene, 2009; Henriet et al., 2009). Studien lassen vermuten, dass A3G mit der Elongation der Reversen Transkription, der Synthese des minus-Stranges, dem Transfer des Plus- und Minusstranges, mit dem tRNA-Priming als auch mit der Integration der viralen DNA interferiert und so die HIV-Replikation inhibiert.

1.5.2. Neutralisierung der antiviralen Aktivität von A3G durch Vif

Schon früh war bekannt, dass Vif (vormals als *sof* für *short open reading frame* bezeichnet) einen deutlichen Einfluss auf die Infektiosität von HIV-1 aus nicht permissiven Zellen hat (von Schwedler et al., 1993). Beim akzessorischen HIV-1 Protein Vif, welches erstmals im Jahr 1986 beschrieben wurde (Lee et al., 1986, Sodroski et al., 1986), handelt es sich um ein 23 kDa großes basisches Protein mit einer Länge von 192 Aminosäuren, das in der späten Phase der Virusreplikation exprimiert wird. Neben HIV-1 kodieren bis auf EIAV (*equine infectious anemia virus*) alle relevanten Lentiviren ein Vif-Protein. Im Jahre 2002 wurde dann durch Sheehy et al. mit APOBEC3G der Gegenspieler von Vif identifiziert. Nachfolgende Studien konnten belegen, dass die Hauptfunktion von Vif in der Induktion einer Ubiquitin-abhängigen Degradation von A3G durch das zelluläre 26S Proteasom besteht, die zur Neutralisierung der durch A3G vermittelten antiviralen Aktivität führt (Conticello et al., 2003; Marin et al., 2003; Sheehy et al., 2003; Stopak et al., 2003; Mehle et al., 2004b; Kobayashi et al., 2005) (siehe Abb. 1.5).

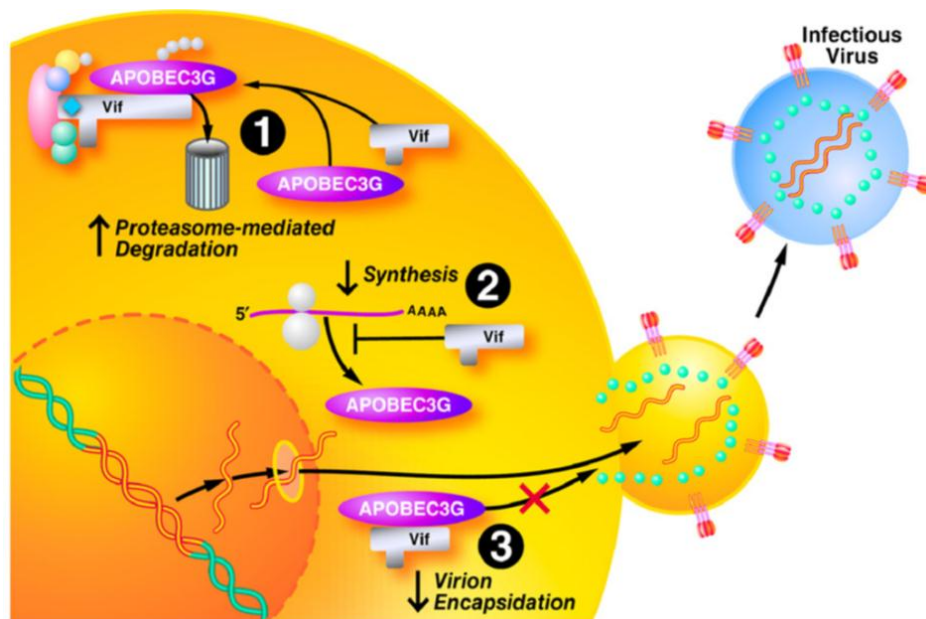


Abbildung 1.5: Mechanismen der Vif vermittelten Neutralisierung von A3G. (1) Restriktion der antiviralen Aktivität von A3G durch Vif vermittelte proteasomale Degradation. (2) Degradations-unabhängige Restriktion von A3G durch Vif induzierte Hemmung der mRNA Translation und (3) Blockierung der A3G Partikelinkorporation (nach Chiu und Greene, 2009).

Neben dem induzierten proteasomalen Abbau von A3G gibt es Hinweise auf Degradations-unabhängige Mechanismen, die zur Restriktion von A3G führen (Stopak et al., 2003; Kao et al., 2004, 2007; Santa-Marta et al., 2005; Goila-Gaur et al., 2008; Mercenne et al., 2010). Dabei scheint Vif unter anderem die Translation von A3G zu inhibieren (Stopak et al., 2003; Mercenne et al., 2010). Darüber hinaus konnten Goila-Gaur et al. zeigen, dass eine Koexpression von Vif zu einer Anreicherung von A3G in hochmolekularen Ribonukleoproteinkomplexen (HMM) führt (Goila-Gaur et al., 2008). Wie bereits erwähnt geht von in HMM-Komplexen gebundenem A3G keine antivirale Aktivität aus. Ein weiterer Vif abhängiger Restriktionsmechanismus besteht in der direkten Hemmung der Partikelinkorporation von A3G.

1.5.3. Vif vermittelte proteasomale Degradation von A3G

Der proteasomale Abbau wird durch die direkte Interaktion von Vif mit A3G initialisiert. Nachfolgend rekrutiert das an A3G gebundene Vif-Protein einen aus den zellulären Proteinen

ElonginC, EonginB, Cullin5, Rbx und Nedd8 bestehenden E3-Ubiquitin Ligase Komplex (Mehle et al, 2004a; Yu et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; Shirakawa et al., 2006) (siehe Abb. 1.6). Erst kürzlich wurde mit CBF- β ein weiterer bislang unbekannter Vif-Interaktionspartner identifiziert, der an der Formierung des E3-Ligase Komplexes durch einen noch unbekanntem Mechanismus beteiligt ist (Jäger et al., 2011; Zhang et al., 2011; Hultquist et al., 2012). Im Komplex mit der E3-Ubiquitin Ligase erfolgt die Polyubiquitinierung von A3G. Dabei werden durch eine E1-Ligase aktivierte Ubiquitinmoleküle auf eine E2-Ligase übertragen, die ihrerseits an Rbx bindet und nachfolgend Ubiquitin kovalent an das mit dem E3-Ligase-Komplex assoziierte A3G-Protein anheftet (Hershko und Ciechanover, 1998; Pickart, 2001; Ehrlich und Yu, 2006). Die Frage, an welchen Aminosäureresten in A3G die Ubiquitinierung erfolgt und ob auch Vif im Komplex mit A3G ubiquitiniert wird, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden (Dang et al., 2008; Iwatani et al., 2009; Shao et al., 2010). Ähnlich wie im Fall von A3G induziert Vif ebenfalls den proteasomalen Abbau von A3C, A3DE und A3F über die Bildung eines E3-Ligase Komplexes (Liu et al., 2005; Pery et al., 2009).

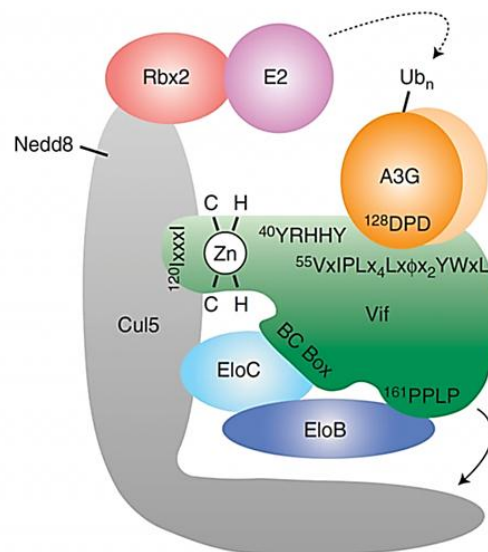


Abbildung 1.6: Struktureller Aufbau des Vif-A3G-E3-Ligase Komplexes (nach Malim und Bieniasz, 2012).

Die Interaktion von Vif mit A3G und A3F erfolgt über mehrere Sequenzbereiche, die im N-terminalen Bereich von Vif lokalisiert sind. Mutationsanalyse haben ergeben, dass Vif im Wesentlichen über den Sequenzbereich Y⁴⁰RHHY⁴⁴ und Y⁶⁹XXL⁷² eine direkte Bindung mit A3G eingeht, wohingegen die Interaktion mit A3F durch die Bereiche D¹⁴RMR¹⁷ und Y⁶⁹XXL⁷² vermittelt wird (Schröfelbauer et al., 2006; Russell und Pathak, 2007; He et al.,

2008; Yamashita et al., 2008; Pery et al., 2009; Russell et al., 2009). Es konnten weitere Regionen in Vif identifiziert werden, die zwar keine entscheidende Rolle bei der direkten Interaktion mit A3G spielen, jedoch dessen neutralisierende Funktion beeinflussen. Dazu gehören die Aminosäureregionen $W^{21}xSLVK^{26}$, $L^{81}GxGxxIxW^{89}$, $T^{96}(Q/D/E)x(5)ADx(2)(I/L)^{107}$ und $E^{171}DRW^{174}$ (Chen et al., 2009; Dang et al., 2009, 2010a, 2010b).

Auf Seiten des A3G Proteins erfolgt die Bindung an Vif über die Aminosäureregion $F^{126}WDPDYQ^{132}$, die mit der für die Multimerisierung und Partikelinkorporation essentiellen Region $Y^{124}YFW^{127}$ überlappt. Vergleichsstudien mit A3G aus afrikanischen Grünen Meerkatzen (AGM) konnten zeigen, dass der Aspartatrest (D) an Position 128 die Sensitivität von humanem A3G gegenüber Vif determiniert. In agmA3G befindet sich an dieser Position ein Lysin (K). Ein Austausch des Aspartatrestes in humanem A3G gegen Lysin resultierte in einem A3G-Protein, das nicht mehr mit HIV-1 Vif interagiert, jedoch sensitiv gegenüber SIV_{AGM} Vif war. Die Substitution von K zu D in agmA3G führte hingegen zu einer A3G-Mutante, die resistent gegenüber SIV_{AGM} Vif und gleichzeitig sensitiv gegenüber HIV-Vif war (Bogerd et al., 2004; Mangeat et al. 2004; Schröfelbauer et al., 2004; Xu et al. 2004). Im Fall von humanem A3F erfolgt die Interaktion mit HIV-1 Vif über die Aminosäuren im Bereich von 283-300 und an Position 324 (Russel et al., 2009; Albin et al. 2010; Smith und Pathak, 2010).

Die Bindung von Vif an den E3-Ligase Komplex erfolgt nach bisherigen Erkenntnissen im Wesentlichen durch eine direkte Interaktion zweier Bereiche in der C-terminalen Vif-Domäne mit Cullin5 und ElonginC. In vitro-Analysen haben ergeben, dass weite Teile der C-terminale Domäne in ungebundene Zustand unstrukturiert vorliegen (Reingewertz et al., 2009, 2010). Der direkte Kontakt von Vif mit Cullin5 wird über ein Zink bindendes Proteinmotiv ($H^{108}-X_5-C-X_{17-18}-C-X_{3-5}-H^{139}$, HCCH) vermittelt. Eine Mutation dieses Motivs unterbindet die Interaktion mit Cullin5 und resultiert damit in einer Störung der Vif-induzierten A3G Degradation (Luo et al., 2005; Mehle et al., 2006; Xiao et al., 2007). Die Bindung an ElonginC erfolgt über einen dem HCCH-Motiv benachbarten Sequenzbereich ($S^{144}LQYLA^{149}$), der auch als BC-Box bezeichnet wird. Die BC-Box findet sich in ähnlicher Form noch in einer Vielzahl von zellulären, wie SOCS1-4 (Okumura et al., 2012) und VHL (Kibel et al., 1995), sowie viralen Adaptorproteinen, wie beispielsweise NS1 aus RSV (Elliot et al., 2007; Straub et al., 2011), wo sie ebenfalls die Interaktion mit ElonginC vermittelt.

Sequenzvergleiche verschiedener Vif-Proteine konnten zeigen, dass die BC-Box der am höchsten konservierte Sequenzbereich des Vif-Proteins ist (Oberste und Gonda, 1992; Pace

et al., 2006; Jacobs et al., 2008; Dang et al., 2010b). Dies lässt auf die große Wichtigkeit der BC-Box für die Funktion von Vif schließen. Eine Mutation der BC-Box, und hier speziell der Aminosäure an Position 145 resultiert in einer Störung der Vif-ElonginC-Interaktion und damit verbunden in einer Inhibition des proteasomalen Abbaus von A3G (Mehle et al., 2004a; Yu et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; LaRue et al., 2010). Wie Mehle et al. darüber hinaus demonstrieren konnten, wird die Bindung von Vif an ElonginC durch die Phosphorylierung des Serinrestes an Position 144 negativ reguliert (Mehle et al., 2004a). Neben dem Serinrest an Position 144 konnten noch die Threoninreste an Position 96, 155 und 188 sowie Serin an Position 165 als Kinasesubstrate identifiziert werden. (Yang et al., 1996, 1998).

Experimente mit Primaten unterstreichen die Wichtigkeit der BC-Box für die Funktion von Vif (Schmitt et al., 2009, 2010). Im vorliegenden Fall wurden Makaken mit einer Virus-Rekombinante aus SIVmac und HIV-1 (SHIV) infiziert, die für ein Vif-Protein mit mutierter BC-Box kodiert. Tiere, die mit einem nicht modifizierten SHIV-Klon transduziert worden waren, dienten als Kontrollgruppe. Als Marker für den Infektionsverlauf wurden die RNA-Viruslast im Plasma und die Konzentration an zirkulierenden CD4 positiven T-Zellen über einen Zeitraum von 24-28 Wochen bestimmt. Eine Analyse der Messwerte ergab, dass es in Folge einer Infektion mit dem mutierten SHIV im Gegensatz zur Kontrollgruppe zu keiner nennenswerten Reduktion der Konzentration an CD4 positiven T-Zellen kam. Darüber hinaus war die Viruslast bei den mit dem mutierten SHIV transduzierten Makaken um mehrere Log-Stufen niedriger als bei der Kontrollgruppe. Eine Sequenzanalyse von Virusisolaten aus verschiedenen Geweben ergab außerdem, dass im Fall der mit der Virusmutante infizierten Tieren der Anteil an G zu A Substitutionen signifikant erhöht war, was auf eine Editierung durch APOBEC3 Proteine zurückgeführt wurde (Schmitt et al., 2009).

Neben dem HCCH-Motiv und der BC-Box befinden sich in der C-terminalen Domäne (CTD) noch weitere Sequenzbereiche, die für die Aktivität von Vif essentiell sind. Frühe Funktionsanalysen konnten belegen, dass Vif in der Lage ist, mit sich selbst Komplexe zu bilden (Yang et al. 2001). Die Multimerisierung wird dabei von einem 4 Aminosäure umfassenden Sequenzmotiv (P¹⁶¹LPP¹⁶⁴) vermittelt. Eine Mutation des PLPP-Motivs resultiert in einer Inhibition der Vif-Multimerisierung als auch in einer verminderten Infektiosität von HIV-1, das in nicht-permissiven Zellen generiert wurden (Yang et al., 2001, 2003). Weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass die Multimerisierung von Vif eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit A3G spielt (Miller et al., 2007; Donahue et al., 2008; Techtmann et al., 2012). Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine direkte Interaktion des PLPP-Motivs mit ElonginB innerhalb des E3 Ligase Komplexes (Bergeron et al., 2010). Untersuchungen mit

aufgereinigten CTD-Fragmenten ergaben außerdem, dass das PLPP-Motiv in die direkte Interaktion von Vif mit Cullin5 involviert ist, aber eine im Vergleich zum HCCH-Motiv deutlich geringe Affinität gegenüber Cullin5 aufweist (Wolfe et al., 2010). Zwischen der BC-Box und dem Dimerisierungsmotiv konnte an Position 149-151 eine Proteaseschnittstelle identifiziert werden, an der eine durch die virale Protease vermittelte proteolytische Spaltung von Vif innerhalb des Viruspartikels erfolgt (Kahn et al., 2002). Eine Inaktivierung der Schnittstelle korrelierte negativ mit der Virusreplikation in nicht-permissiven H9-Zellen, zeigte jedoch keinen Effekt auf die Virusvermehrung in permissiven Jurkat-Zellen.

1.5.4. Weitere von der A3G Restriktion unabhängige Funktionen von Vif

Neben der Inhibition von A3G weist Vif weitere Funktionen auf. So beeinflusst Vif die Virusreplikation durch Regulation des Zellzyklus (Dehart et al., 2008, Izumi et al., 2010). Des Weiteren induziert Vif im Zusammenspiel mit dem HIV-Protein Vpr den proteasomalen Abbau von IRF-3 (*Interferon regulatory factor 3*), einem Transkriptionsfaktor, der die Expression von IFN-1 reguliert und damit eine zentrale Rolle bei der Induktion der angeborenen Immunantwort spielt (Okumura et al., 2008). Zudem konnte eine direkte Interaktion von Vif mit den Src Tyrosin-Kinasen Hck und Fyn festgestellt werden (Hassaine et al., 2001; Douaisi et al., 2005). In Anwesenheit von Vif war deren Kinaseaktivität deutlich reduziert. Interessanterweise konnte hier auch gezeigt werden, dass beide Kinasen A3G als Substrat erkennen und dieses phosphorylieren. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Vif direkt mit der Reversen Transkriptase interagiert und dadurch deren Prozessivität erhöht (Cancio et al., 2004, Kataropoulou et al., 2009). Die Interaktion mit der Reversen Transkriptase erfolgt dabei über die C-terminale Domäne von Vif.

1.5.5. Die Vif vermittelte Neutralisation von A3G als Ziel für antivirale Wirkstoffe

Ausgehend von den bisherigen Forschungsergebnissen, stellt die Hemmung der Vif induzierten Restriktion von A3G eine neue vielversprechende Therapiestrategie bei der Behandlung von HIV-1 Infektionen dar. Ein Erhalt der antiviralen Aktivität von A3G in Gegenwart von Vif kann dabei über mehrere Wege erreicht werden. Ein attraktiver Ansatz besteht in der Inhibition des Vif induzierten proteasomalen A3G-Abbaus durch Blockierung der direkten Interaktion zwischen Vif und dem APOBEC3 Protein. Eine direkte Hemmung der Proteininteraktion kann

wie bereits durch Mehle et al. demonstriert, durch den Einsatz von Vif abgeleiteten Peptiden erreicht werden. Im vorliegenden Experiment wurde eine Reihe von 14-mer Vif-Peptiden synthetisiert und deren inhibitorische Wirkung auf die A3G-Vif-Interaktion mittels eines *in-vitro* Kompetitionsassays quantifiziert (Mehle et al. 2007). Die höchste inhibitorische Aktivität ging dabei von zwei Vif-Peptiden aus, die die für die Interaktion mit A3G essentiellen Sequenzbereiche Y⁴⁰RHHY⁴⁴ und Y⁶⁹XXL⁷² umfassen. Kürzlich wurden zwei niedermolekulare Verbindungen mit der Bezeichnung IBM-26 und IBM-35 in einem Hochdurchsatzscreening identifiziert, die selektiv die Interaktion zwischen Vif und APOBEC3G hemmen (Cen et al., 2010). Im Rahmen von Replikationsversuchen mit nicht-permissiven Zellen hemmten beide Substanzen effektiv die Vermehrung von HIV-1.

Neben der A3G-Vif-Interaktion stellt die Vif vermittelte Rekrutierung des E3-Ligase Komplexes ein weiteres potentiell wirkstoffziel dar. Wie bereits erwähnt, geht Vif im Ligase-Komplex eine direkte Verbindung mit sowohl ElonginC als auch Cullin5 ein. Aufgrund der Verfügbarkeit von Strukturdaten, die ein zielgerichtetes Wirkstoffdesign ermöglichen, stellt hier besonders die Vif-ElonginC-Interaktion eine höchst attraktive Zielstruktur für Wirkstoffe dar. Im Jahre 2008 konnte Stanley et al. die dreidimensionale Struktur eines Interaktionskomplexes bestehend aus einem die BC-Box umfassenden Vif-Fragments, ElonginC und ElonginB auflösen (Stanley et al., 2008). Davor stand lediglich ein computergestütztes Modell zur räumlichen Struktur dieses Proteinkomplexes zur Verfügung (Lv et al., 2007). Bis heute konnten bis auf die Struktur des Vif-ElonginC-Komplexes keine weiteren für die Vif abhängige Inhibition von A3G relevanten Protein-Protein-Interaktionskomplexe aufgelöst werden. Erst kürzlich wurde mit VEC-5 eine Substanz entwickelt, die durch spezifische Bindung an ElonginC die Wechselwirkung mit Vif verhindert (Zuo et al., 2012). Wie eindeutig demonstriert werden konnte, hemmt VEC-5 effektiv den durch Vif induzierten Abbau von sowohl A3G als auch A3C und A3F. Eine Behandlung von HIV-1 replizierenden nicht-permissiven Zellen mit VEC-5 resultierte in einer massiven Hemmung der Virusvermehrung.

Wie Xiao et al. experimentell darlegen konnten, stellt auch die Interaktion zwischen Vif und Cullin5 ein potentiell wirkstoffziel für antiretroviral wirkende Substanzen dar (Xiao et al., 2007). Im vorliegenden Fall wurde zur Hemmung der Vif-Cullin5-Interaktion der Zinkchelator TPEN verwendet.

Neben der Interaktion von Vif mit A3G als auch mit Komponenten des E3-Ligase Komplexes stellt auch die Vif-Dimerisierung ein weiteres potentiell wirkstoffziel dar. Eine

Inhibition der Dimerisierung durch ein das PLPP-Motiv umfassendes Peptid supprimierte effektiv die Infektiosität von HIV-1 (Yang et al., 2003; Miller et al., 2007).

Weitere niedermolekulare Inhibitoren, die im Zusammenhang mit der Vif induzierten Restriktion von A3G publiziert wurden, sind RN-18 (Nathans et al., 2008; Ali et al., 2012) und SN-2 (Ejima et al., 2011). Die erste der beiden Substanzen wurde im Rahmen eines Hochdurchsatzscreenings aus einer Substanzbibliothek mit 30.000 Einzelverbindungen isoliert. RN-18 antagonisiert die Funktion von Vif und hemmt dadurch den proteasomalen Abbau von APOBEC3G. In Replikationsversuchen mit infektiösen Viruspartikeln verursachte RN-18 eine signifikante Hemmung der viralen Replikation. Untersuchungen ergaben, dass RN-18 die Expression von Vif in Gegenwart von A3G durch einen noch unbekanntem Mechanismus herunterreguliert.

Bei SN-2 handelt es sich um ein Derivat der Substanz SN-1, die ursprünglich für die Inhibition des Zinkfingerproteins HIV-EP1 (*HIV enhancer protein*) entwickelt wurde (Fujita et al., 1996; Otsuka et al., 1997). Funktionell ist SN-2 ein Zinkchelator, der in Gegenwart von Vif den Abbau von A3G und damit verbunden die Virusreplikation hemmt. Genau wie im Fall von RN-18 ist der genaue Wirkmechanismus von SN-2 noch ungeklärt.

1.6. Identifizierung von Inhibitoren des Proteinabbaus

Eine gängige Strategie, die bei der Suche nach Proteinabbauinhibitoren verfolgt wird, ist die Markierung des vom Abbau betroffenen Zielproteins mit einem leicht zu detektierenden Reporterprotein. Der Abbau eines auf diese Weise modifizierten Zielproteins kann einfach über die Messung der Reporterkonzentration verfolgt werden. Eine Hemmung des Proteinabbaus durch niedermolekulare Verbindungen lässt sich dann anhand einer Hochregulation des Reporterexpressionsniveaus feststellen. Im Zusammenhang mit dem proteasomalen Abbau von A3G sind bis jetzt drei fluoreszenzbasierte zelluläre Testsysteme beschrieben worden. So nutzte Conticello et al. ein am N-Terminus mit GFP markiertes A3G Protein für Untersuchungen zur Kinetik des Vif induzierten APOBEC3G Abbaus (Conticello et al., 2003). In zwei weiteren Studie wurde ein C-terminal mit EYFP markiertes A3G für die Durchmusterung einer Substanzbibliothek verwendet (Nathans et al., 2008; Cen et al., 2010).

In ganz ähnlicher Weise verfährt man bei der Suche nach niedermolekularen Inhibitoren des zellulären Proteasomsystems. Hier nutzt man als Sonde für den proteasomalen Proteinabbau Fusionsproteine, die aus einem Reporterprotein und einer Proteindomäne bestehen. Diese Proteindomäne vermittelt einen raschen Abbau des Fusionskonstrukts durch das Proteasom (Bence et al., 2005; Menéndez-Benito et al., 2005). Zwei Abbaudomänen, die

häufigen Einsatz finden sind die der Ornithin-Decarboxylase (ODC) und die vom *hypoxia inducible factor 1 α* (HIF-1 α) abgeleitete *oxygen dependent degradation domain* (ODD) (D'Angelo et al., 2003; Kimbrel et al., 2009; Chou et al., 2011). Erstere vermittelt einen schnellen Ubiquitin-unabhängigen proteasomalen Proteinabbau, wohingegen die ODD-Domäne für den rapiden konstitutiven Ubiquitin-abhängigen Abbau von HIF-1 α verantwortlich ist (Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999). HIF-1 α ist zusammen mit weiteren Faktoren für die Induktion einer Stressantwort bei Unterversorgung von Zellen mit Sauerstoff verantwortlich. Bei normaler Versorgung erfolgt eine enzymvermittelte Hydroxylierung zweier in der ODD-Domäne lokalisierter Prolinreste (Jaakkola et al., 2001; Chan et al., 2005). Dieser Schritt ermöglicht die spezifische Erkennung von HIF-1 α durch das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (VHL) und dessen Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau. Initiiert wird die Degradation durch die VHL vermittelte Verlinkung von HIF-1 α mit einem E3-Ubiquitin Ligase Komplex, bestehend aus ElonginC, ElonginB, Rbx1 und Cullin2 (Lisztwan et al., 1999; Ohh et al., 2000). Innerhalb dieses Ligase-Komplexes geht VHL eine direkte Interaktion mit ElonginC ein, die durch eine BC-Box vermittelt wird (Stebbins et al., 1999).

In der Regel stellt sich der Abbau von Proteinen als ein Mehrstufenprozess dar. Im Fall des Abbaus von A3G sind eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen involviert, wie die direkte Wechselwirkung zwischen Vif und A3G sowie zwischen Vif und Bestandteilen des E3 Ligase Komplexes. Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, von denen die FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) als auch die BiFC (bimolekulare Fluoreszenzkomplementation) Methode die Untersuchung von Proteinwechselwirkungen in lebenden Zellen erlauben (Ghosh et al., 2000; Truong und Ikura, 2001; Hu et al., 2002; Ohad et al., 2007). Das Grundprinzip der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation besteht in der Assoziation zweier komplementärer, von einem fluoreszierenden Protein abgeleiteten nicht-fluoreszierender Proteinfragmente (Abb. 1.7). Die Fragmente umfassen dabei die N-terminale bzw. C-terminale Hälfte des fluoreszierenden Proteins. Zur Nutzung der BiFC-Methode für die Visualisierung einer Protein-Protein-Interaktion *in vivo*, müssen die Fragmente zuvor mittels molekularbiologischer Methoden an die zu untersuchenden Interaktionspartner gekoppelt werden. Infolge der direkten Interaktion der Interaktionspartner werden die nicht-fluoreszierenden Fragmente in unmittelbare Nähe zueinander gebracht und es kommt zu deren Zusammenlagerung (Komplementation). Die komplementierten Fragmente bilden zusammen ein voll funktionsfähiges Vollprotein, das nach Anregung Licht entsprechender Wellenlänge emittiert.

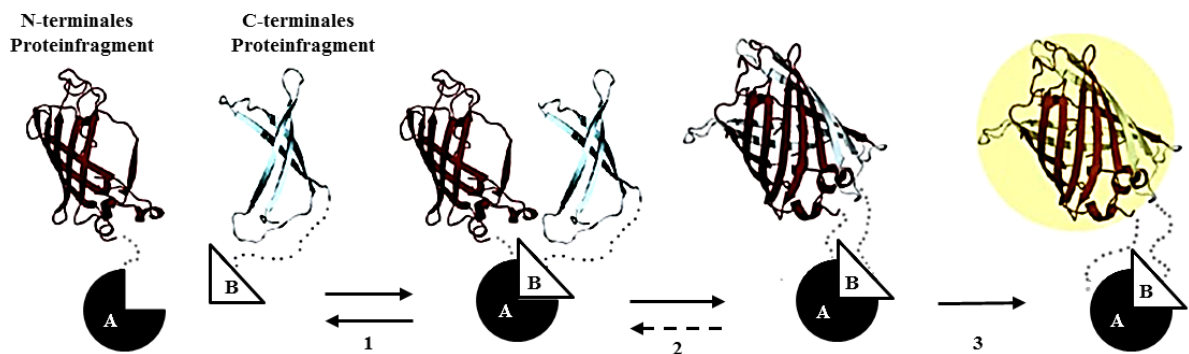


Abbildung 1.7: Prinzip der biomolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Schritt 1 = direkte Interaktion der zu untersuchenden Interaktionspartner A und B, Schritt 2 = Komplementation der nicht-fluoreszierenden Proteinfragmente. Schritt 3 = Reifung des Fluorophors.

Bis zur Entwicklung der EYFP Variante Venus als BiFC-Reporterprotein beschränkte sich die Anwendung der BiFC-Technik auf Temperaturen um 30°C. Venus als BiFC-Reporter hingegen ermöglicht eine Visualisierung von Protein-Protein-Interaktionen auch bei 37°C (Shyu et al., 2006).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die Cytidineaminase APOBEC3G ist ein potenter Restriktionsfaktor der HIV-Replikation. Der der Restriktion zugrunde liegende molekulare Mechanismus basiert nach jetzigem Wissenstand hauptsächlich auf einer Deaminase-katalysierten G zu A-Hypermutation des viralen Genoms während der Reversen Transkription. Neben dieser Deaminase-abhängigen Virushemmung sind auch Deaminase-unabhängige Restriktionsmechanismen für APOBEC3G beschrieben worden. Die antiretrovirale Wirkung von A3G wird durch das HIV-1 akzessorische Protein Vif (*virion infectivity factor*) neutralisiert. Im Detail induziert Vif durch eine direkte Wechselwirkung mit A3G dessen Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau. Eine Störung der Degradation führt zum Erhalt der von A3G ausgehenden antiviralen Aktivität. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten bereits einige niedermolekulare Verbindungen identifiziert werden, die den Vif induzierten A3G-Abbau effektiv hemmen. Jedoch hat noch keiner dieser Wirkstoffe Eingang in klinische Studien gefunden.

Ein Ziel des vorliegenden Dissertationsprojektes war die Etablierung von fluoreszenzbasierten zellulären Testsystemen für die Identifizierung weiterer niedermolekularen Inhibitoren des Vif induzierten A3G-Abbaus im Hochdurchsatzverfahren. Eines dieser Testsysteme erfasst dabei den Vif induzierten Abbau von A3G. In Ergänzung zu

diesem System sollten Hochdurchsatz-fähige Kontrolltestsysteme entwickelt werden, die zur Identifizierung falsch-positiver oder falsch-negativer Wirkstoffe genutzt werden können.

Der Vif induzierte Abbau von A3G stellt sich als ein mehrstufiger Prozess dar, in dem neben der direkten Interaktion zwischen Vif und A3G der Interaktion von Vif mit ElonginC eine Schlüsselrolle zukommt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines auf der BiFC-Technik basierenden Systems, das zur Analyse der direkten Vif-ElonginC-Interaktion in lebenden Zellen sowie zur Identifizierung von Interaktionsinhibitoren eingesetzt werden kann. Weiterhin sollte die Wirkung von neu entwickelten Vif-ElonginC-Interaktionsinhibitoren auf den A3G-Abbau analysiert werden.

Als einer der ersten niedermolekularen Inhibitoren des A3G-Abbaus konnte eine Substanz mit der Bezeichnung RN-18 identifiziert werden. Im Rahmen des vorliegenden Promotionsprojektes wurde RN-18 als Leitstruktur für die Synthese von Derivaten genutzt und deren inhibitorische Aktivität analysiert.

2. Material

2.1. Relevante Gerätschaften

Bezeichnung	Hersteller
Tpersonal PC (PCR-Thermozykler)	Biometra
FACS Calibur und FACS Vantage (Cytometer)	Becton Dickinson
Safire2 (Fluorometer)	Tecan
DMIRE2 (Fluoreszenzmikroskop)	Leica
ABI Prism 3100 Analyzer (DNA-Sequenzierung)	Applied Biosystems

2.2. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Albumin Fraktion V (Kat. A1391)	Applichem
Complete Proteaseinhibitormix (Kat. 11697498001)	Roche
Doxycyclin (Kat. 631311)	Clontech
Dimethylsulfoxid (Kat. A3672)	Applichem
Formaldehyd 16% (w/v) (Kat. 28908)	Thermo
Magermilchpulver (Kat. A0830)	Applichem
MG132 (Kat. C2211)	Sigma-Aldrich
MTT (Kat. M2128)	Sigma-Aldrich
PEI, linear, MW 25.000 (Kat. 23966)	Polysciences
Puromycin (Kat. Ant-pr-1)	Invivogen
PYR41 (Kat. 662105)	Calbiochem
Rothiphorese Gel 30 (Kat. 3029)	Roth
TEMED (Kat. 2367)	Roth
Fötales Rinderserum (Kat. S0115 und S0615)	Biochrom
Hanks´ balanced Salt Solution (Kat. H9269)	Sigma-Aldrich
Fluorescence Mounting Medium	Dako

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle weiteren Chemikalien von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Applichem, Fermentas, Fluka, und Merck bezogen. Es wurden stets

Chemikalien mit einem höheren als Industriereinheitsgrad verwendet. Die Lagerung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

2.3. Antikörper

Die Lagerung der Antikörperstammlösungen erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper. Pab, polyklonaler Antikörper; Mab, monoklonaler Antikörper; HRP, Meerrettich-Peroxidase; VL, Volllänge

Bezeichnung	Epitop	Hersteller (ID number)
(primär)		
rabbit α -GFP (FL) #, Pab	GFP (VL)	Santa Cruz (sc-8334)
mouse α -p24 (24-4), Mab	p-24 Gag	Santa Cruz (sc-69728)
rabbit α -GAPDH (FL335), Pab	human GAPDH (VL)	Santa Cruz (sc-25778)
goat α -A3G (Q17), Pab	humanA3G (internal)	Santa Cruz (sc-27521)
goat α -DsRED (C20), Pab	DsRED (C-terminus)	Santa Cruz (sc-33354)
mouse α -Vif(319), Mab	Vif (VL)	Santa Cruz (sc-69731)
α -Ub, Ascites	Ubiquitin (VL)	BD (550944)
(sekundär)		
donkey α -goat HRP, Pab	goat IgG	Santa Cruz (sc-2020)
goat α -rabbit HRP, Pab	rabbit IgG	Santa Cruz (sc-2004)
goat α -mouse HRP, Pab	mouse IgG	Santa Cruz (sc-2005)
goat α -mouse HRP, Pab	mouse IgG	Dako (P0447)

Kreuzreaktiv mit EYFP, Venus and SBFP2

2.4. Nukleinsäuren

2.4.1. Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Von allen Primern wurde unmittelbar nach Lieferung, wenn nicht anders angegeben eine 50 pmol/ μ L Stammlösung in dH₂O hergestellt. Die Lagerung der Lösungen erfolgte bei -20°C.

Tabelle 2.2: Verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
Vif aa139 AgeI fwd	CGAACCGGTCATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTAC
Vif aa139 V142G AgeI fwd	CGAACCGGTCATAACAAGGGAGGATCTCTACAGTAC
Vif aa139 L145A AgeI fwd	CGAACCGGTCATAACAAGGTAGGATCTGCACAGTAC
Vif aa139 A149C AgeI fwd	CGAACCGGTCATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGT GTCTAGCA
Vif aa139 A149L AgeI fwd	CGAACCGGTCATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGT ACTAGCA
Elongin C N-terminus filler fwd	GGTGGCTGTGAAGGACCTGATGCCATGTATGTCAAATTG
Elongin C AgeI fwd	CGAACCGGTATGGATGGAGAGGAGAAAACCTATGGTGGCT GTGAA
Elongin C BamHI Stop rev	CGAGGATCCTTAACAATCTAAGAAGTTCGC
EloC S100 S103 fwd	CCTGAAATTTCACTGGAATCGCTGATGGCT
EloC S100 S103 rev	AGCCATCAGCGATTCCAGTGAAATTTCAAG
Cerulean/Venus ClaI fwd Kozak	CGAATCGATCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
Cerulean/Venus 155-238 ClaI fwd Kozak	CGAATCGATCGCCACCATGACCGCCGACAAGCAGAAGAAC
ECFP177 rev EcoRI	CGCTGCGAATTCTGATGTTGTGGCGGATCTTGAAG
ECFP rev EcoI	CGCGGCGAATTCTCTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTG
GGGSx6 fwd EcoRI	AATTCCGGGTGGCGGAGGTTCAAGTGGCGGAGGTTCAAGT GGCGGAGGTTCAAGTGGCGGAGGTTCAAGTGGCGGAGGTT CAGGTGGCGGAGGTTCAA
GGGSx6 rev AgeI	CCGGTTGAACCTCCGCCACCTGAACCTCCGCCACCTGAACC TCCGCCACCTGAACCTCCGCCACCTGAACCTCCGCCACCTG AACCTCCGCCACCCGG
Vif L145A fwd	AACAAGGTAGGATCTGCACAGTACTTGGCACTA
Vif L145A rev	TAGTGCCAAGTACTGTGCAGATCCTACCTTGT
Vif H43A/Y44A fwd	GGTTTTATAGACATGCAGCAGAAAGTACTAATCC
Vif H43A/Y44A rev	GGATTAGTACTTTCTGCTGCATGTCTATAAAACC
Vif ClaI start Kozak	CGAATCGATCGCCACCATGGAAAACAGATGGCAGGTG
DsRed monomer N1 KpnI start Kozak	CGAGGTACCCGCCACCATGGACAACACCGAGGACGT
DsRed monomer N1 NotI stop	TCGGCGGCCGCTACTGGGAGCCGGAGTGGC
Vif KpnI fwd	TAATAAGGTACCAAATGGAAAACAGATGGCAGG
Vif NotI rev	ATTATTGCGGCCGATTTTATCTAGTGTCCATTCATTG
TetR BamHI fwd	AATAATGGATCCCGTCAGATCGCCTGGAGACGCC
TetR MluI rev	AATAATACGCGTTTACTTAGTTACCCGGGGAGCATG
TreTight-H2BGFP MluI fwdI	GACATTAACGCGTAAAATAGGCGTATCACGAGG
TreTight-H2BGFP SpeI revI	GTGGGAGGACTAGTAAAGCAAGTAAAACCTCTAC
pIRES-fwd	CACTGCTTACTGGCTTATCG
pIRES-rev	TTAGCGCAGAAGTCATGCC
pWPXL fwd	CATACAAACTAAAGAATTAC
pWPXL revI	ACCAGGATGGGCACCACCC
pWPXL revI	GCGTAAAAGGAGCAACATAG
pWP sequencing fwd	AGAGAGACAGAGACAGATCCATTCG
pGJ3EGFP nested EGFP fwd	GAACAGATGGTCCCCAGATATGGCC
pGJ3EGFP nested EGFP rev	AAAAAGTGGCTAAGATCTACAGCTG
EYFP AgeI fwd	CGAACCGGTATGGTGAGCAAGGGCGAG
EYFP BamHI stop rev	CGAGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTC

2.4.2. Plasmide

Die Lagerung aufgereinigter Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C in sterilem 1x TE-Puffer.

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide. wt, wildtypisch

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pGJ3EGFP	HIV-1 Reportergenvektor	Leurs et al., 2003
pIRESpuro	Mammalier Expressionsvektor	Clontech (Kat. 6031-1)
pIRES-EYFP-LL-A3G	EYFP-A3G	M. Kirschner
pIRES-ECFP-LL-A3GΔC	ECFP-A3GΔC	M. Kirschner
pWPXL	HIV-1 Reportergenvektor	Addgene (Kat. 12257)
pWPXL ODD(aa401-603)-SBFP2	ODD-SBFP2	Otto, 2010
pDsREDmonomerN1	DsREDmonomer	Clontech (Kat. 632465)
pIRES-ClaI-A3G	hA3G (wt)	M. Kirschner
pIRES-Vif wt	Vif (wt)	diese Arbeit
pIRES-Vif H43A/Y44A	Vif (H43A/Y44A)	diese Arbeit
pIRES-Vif L145A	Vif (L145A)	diese Arbeit
pIRES-NVenus-GS-EloC (wt)	NVenus-GS-EloC wt	diese Arbeit
pIRES-NVenus-GS-EloC (A100S/L103S)	NVenus-GS-EloC A100S/L103S	diese Arbeit
pIRES-CVenus-LL-Vif138-192 (wt)	CVenus-LL-Vif138-192(wt)	diese Arbeit
pIRES-CVenus-LL-Vif138-192 (V142G)	CVenus-LL-Vif138-192(V142G)	diese Arbeit
pIRES-CVenus-LL-Vif138-192 (L145A)	CVenus-LL-Vif138-192(L145A)	diese Arbeit
pIRES-CVenus-LL-Vif138-192 (A149L)	CVenus-LL-Vif138-192(A149L)	diese Arbeit
pIRES-CVenus-LL-Vif138-192 (A149C)	CVenus-LL-Vif138-192(A149C)	diese Arbeit
pIRES-CVenus	CVenus	diese Arbeit
pEYFP	EYFP	Clontech (Kat. 6004-1)
pcDNA3.1-A3G	hA3G	Bishop et al., 2004
pACYCDUET-EICB	ElonginB/ElonginC	Bullock et al., 2007
pSBFP2-C1	SBFP2	Kremers et al., 2007
pMD2.G	VSV-G	Addgene (Kat. 12259)
psPAX2	Verpackungsvektor	Addgene (Kat. 12260)
EKARmCerulean/mVenus cytoplasmic	mCerulean/mVenus	Addgene (Kat. 18679)
pUC18	Bakterieller Expressionsvektor	Stratagene (Kat. 200231)
pTet-Off-Advanced	TetOff-Expressionssystem	Clontech (Kat. 631070)
pTRE-Tight	TetOff-Expressionssystem	Clontech (Kat. 631059)

2.5. Zellen

2.5.1. Prokaryontische Zellen

E. coli K12 JM109, Genotyp (endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺))

E. coli K12 DH5α, Genotyp (F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻)

E. coli K12 HB101, Genotyp (F⁻ mcrB mrr hsdS20(r_B⁻ m_B⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^R) glnV44 λ)

E. coli K12 TOP10, Genotyp F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ)

Bei der Klonierungen von retroviralen Vektoren wurde stets *E. coli* K12 HB101 verwendet.

2.5.2. Eukaryontische Zellen

HEK293T (ATCC: CRL-11268) Humane embryonale Nierenzelllinie, die stabil das große T-Antigen aus SV40 exprimiert.

HeLa (ATCC: CCL-2) Humane Zervixkarzinomzelllinie

2.6. Enzyme

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Enzyme und Reaktionspuffer für DNA-Klonierungen von der Firma Fermentas bezogen und laut Herstellerangaben gelagert.

Bezeichnung	Hersteller
Taq-Polymerase (Kat. EP0282)	Fermentas
T4-DNA Ligase (Kat. EL0011)	Fermentas
Antarctic Phosphatase (Kat.M0289)	NEB
RNaseA (Kat. A3832)	Applichem
Proteinase K (Kat. EO 0491)	Fermentas

2.7. Antibiotika-Stammlösungen

Bezeichnung	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Doxycyclin	0,1 mg/mL	optional
Puromycin	1 mg/mL	0,4 µg/mL
Kanamycin	50 mg/mL, gelöst in dH ₂ O	50 µg/mL
Ampicillin	100 mg/mL, gelöst in dH ₂ O	100 µg/mL

Chloramphenicol 50 mg/mL, gelöst in 100% Ethanol 50 µg/mL

Nach der Herstellung (betrifft Kanamycin, Ampicillin und Chloramphenicol) wurden die Lösungen über einen Spritzenfilter (Porenweite 0,2 µm) steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.8. DNA- und Proteingrößenstandards

Als DNA-Größenstandard wurden durch PstI bzw. HindIII verdaute λ-DNA eingesetzt. Die verwendete λ-DNA (Kat. SD0011) sowie PstI und HindIII wurde von der Firma Fermentas bezogen.

Die DNA-Größenstandards wurden wie folgt hergestellt:

λ PstI

333 µL λ-DNA

107 µL dH₂O

50 µL Puffer O

10 µL (≡ 100 U) PstI

Verdau für 18 h bei 37°C

Nachdem Verdau wurden zum jeweiligen Ansatz 333 µL 1xTE-Puffer und 277 µL 6x DNA-Ladepuffer zugegeben. Die Lagerung der DNA-Größenstandards erfolgte bei -20°C.

λ HindIII

333 µL λ-DNA

107 µL dH₂O

50 µL Puffer R

10 µL (≡ 100 U) HindIII

Als Proteinstandard wurde durchweg die *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Kat. 26616) der Firma Fermentas verwendet. Die Lagerung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

2.9. Kits

Bezeichnung

GenElute Gel Extraction Kit (Kat. NA1111)

GenElute PCR Clean-Up Kit (Kat. NA1020)

Plasmid DNA Purification Kit NucleoBond PC500

Roti-Nanoquant (Kat. K880)

Western Blotting Luminol Reagent Kit (Kat. Sc-2048)

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Kat.RR100)

Hersteller

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Macherey-Nagel

Roth

Santa Cruz

Applied Biosystems

2.10. Puffer, Lösungen und Nährmedien

Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

Bezeichnung	Zusatz	Endkonzentration
50x TAE-Puffer	Tris Eisessig EDTA (pH 8,5) in dH ₂ O gelöst	2 M 5,71% (v/v) 50 mM
1x TE-Puffer (pH 8,0)	Tris-HCl (pH 7,6) EDTA (pH 8,0) in dH ₂ O gelöst	10 mM 1 mM
0,5 M EDTA (pH 8,0)	EDTA in dH ₂ O gelöst mit NaOH auf pH 8,0 oder pH 8,5	0,5 M
6x DNA-Probenladepuffer (DLP)	Bromphenolblau Sucrose in dH ₂ O gelöst	0,125% (w/v) 40% (w/v)
3 M Kaliumacetat pH 5,2	Kaliumacetat in dH ₂ O gelöst, mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen	3 M
5 M Kaliumacetat pH 5,2	Kaliumacetat in dH ₂ O gelöst, mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen	5 M
LB-Medium	LB Broth Base NaCl in dH ₂ O gelöst	20 g/L 5 g/L
LB-Amp-Agar	LB Broth Base Agar NaCl Ampicillin in dH ₂ O gelöst, Lagerung bei 4°C	20 g/L 20 g/L 5 g/L 0,1 mg/mL
Transformationspuffer I	MgCl ₂ CaCl ₂ in dH ₂ O gelöst, Lagerung bei 4°C	50 mM 100 mM

Transformationspuffer II	Kaliumacetat	30 mM
	RbCl ₂	100 mM
	CaCl ₂	10 mM
	MnCl ₂	50 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	in dH ₂ O gelöst	
	mit 10% Essigsäure auf pH 5,8 einstellen	
Transformationspuffer III	MOPS	10 mM
	RbCl ₂	100 mM
	CaCl ₂	75 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	in dH ₂ O gelöst	
	mit 1 M KOH auf pH 6,5 einstellen	
Resuspensionspuffer	Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM
	EDTA	50 mM
	Saccharose	15% (w/v)
	in dH ₂ O gelöst, Lagerung bei 4°C	
	RNaseA (Zugabe vor Gebrauch)	0,1 mg/mL
Bakterienlysepuffer	NaOH	0,2 M
	SDS	1% (w/v)
	in dH ₂ O gelöst	
DMEM-Vollmedium	DMEM (powder)	9 g /L
	NaHCO ₃	0,15% (w/v)
	FBS (inaktiviert für 30 min bei 56°C)	9% (w/v)
	Glutamin	0,03% (w/v)
	Penicillin	0,12 mg/mL
	Streptomycin	0,12 mg/mL
	in dH ₂ O gelöst, Lagerung bei 4°C	
ATV	NaCl	137 mM
	KCl	5,4 mM
	D-Glucose	5 mM
	NaHCO ₃	70 mM
	Trypsin	0,5 mg/mL
	in dH ₂ O gelöst, Lagerung bei 4°C	
PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4,3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM
	CaCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
	in dH ₂ O gelöst	

PBS-Waschlösung	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4,3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM
	in dH ₂ O gelöst	
Zellaufschlusspuffer (ZAP)	HEPES (pH7,4)	20 mM
	DTT	1 mM
	Triton-X-100	0,1 % (v/v)
	Complete Proteaseinhibitor	1-fach
	in dH ₂ O gelöst, Lagerung bei -20°C	
25x Complete Proteaseinhibitor	1 Tablette Complete Proteaseinhibitormix (Roche) auf 2 mL dH ₂ O Lagerung bei -20°C	
2x Proteindenaturierungs- puffer (PDP)	Tris-HCl pH 6,8	125 mM
	SDS	2% (w/v)
	Glycerin	30% (v/v)
	β -Mercaptoethanol	2% (w/v)
	Bromphenolblau	2% (w/v)
	DTT	200 mM
	in dH ₂ O gelöst, Lagerung bei -20°C	
Sammelgelpuffer	Tris	0,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
	in dH ₂ O gelöst	
	mit 1 M HCl auf pH 6,8 einstellen	
Trenngelpuffer	Tris	1,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
	in dH ₂ O gelöst	
	mit 1 M HCl auf pH 8,0 einstellen	
SDS PAGE-Laufpuffer	Tris	50 mM
	SDS	0,2% (w/v)
	Glycin	200 mM
	in dH ₂ O gelöst	
Western Blot-Transferpuffer	Glycin	40 mM
	Tris	50 mM
	SDS	0,037% (w/v)
	Methanol	20% (v/v)
	in dH ₂ O gelöst	

TBS	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Tris	25 mM
	in dH ₂ O gelöst mit HCl auf pH 7,4 einstellen	
TTBS	Tween-20 in TBS gelöst	0,1% (v/v)
Blockierungspuffer	Magermilchpulver in TTBS gelöst	5% (w/v)
Sequenzierungspuffer	Tris-HCl pH 9,0 MgCl ₂ in dH ₂ O gelöst	200mM 5 mM
Screeningpuffer	HEPES pH 6,8 Triton-X-100	25 mM 0,125% (w/v)
Zellyse-Puffer (ZLP)	Tris-HCl pH 9,0 EDTA NaCl SDS	10 mM 5 mM, 200 mM, 0,2% (w/v)

2.11. Programme zur Datenauswertung

Bezeichnung	Hersteller
Flow Jo Version 7.6	Tree Star
Prism Version 4	GraphPad
SigmaPlot Version 2001	Systat Software
Excel Version 2007	Microsoft

2.12. Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Ultrafiltrationseinheit Ultracel-100K (Kat. UFC910024)	Millipore
WB Membran Protran 0,2 µm (Kat. 10401396)	Whatman

WB Membran Hybond ECL 0,2 µm (Kat. RPN 3032D)	GE Amersham
Röntgenfilm Contatyp (Kat. XA03.180240100)	Raymed Imaging
WB Filterpapier (Kat. GB58)	Hartenstein
Spritzenfilter Minisart 0,2 µm (Kat. 17597)	Sartorius Stedim
Spritzenfilter Minisart 0,45 µm (Kat. 17598)	Sartorius Stedim
96-Wellplatten schwarz (Kat. 650209)	Greiner
PCR-Reaktionsgefäße (Kat. 781320)	Brand
Sequencing-Tubes (Kat. SP0020)	Peqlab
Lab-TekII 8er-Multiwellobjekträgers (Kat. 155409)	Nunc
Ultrazentrifugationsröhrchen (Kat. 5010)	Seton

Alle weiteren Materialien für die Zellkultur und Molekularbiologie stammten von den Firmen Nunc, Greiner, Sarstedt, Becton Dickinson (BD), Hartenstein, Eppendorf.

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. DNA-Amplifikation mittels PCR

Zur Vermehrung von DNA-Abschnitten für die Klonierung wurde die PCR-Methode angewendet. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die DNA-Amplifikation ausnahmslos mit der Taq-DNA-Polymerase und den dazugehörigen Puffer sowie Lösungen der Firma Fermentas unter den nachfolgend aufgeführten Reaktionsbedingungen. Das Ansetzen der Reaktionsansätze erfolgte auf Eis. Alle PCR-Reaktionen wurden nach dem in Tabelle 3.2 gezeigten Standardprogramm in 0,2 mL fassenden PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug dabei immer 20 µL. Etwa 3-5 µL eines jeden PCR-Ansatzes wurden nach der Amplifikationsreaktion mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die PCR-Produkte auf ihre korrekte Länge hin überprüft. Zur Herstellung größerer Mengen eines PCR-Produktes, wurden lediglich mehrere 20 µL-Ansätze amplifiziert und diese nach gelelektrophoretischer Analyse vereint.

Tabelle 3.1: Standardreaktionsansatz der PCR.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
DNA-Matrize	10 ng/μL	2 μL
Primer (fwd)	50 pmol/μL	1 μL
Primer (rev)	50 pmol/μL	1 μL
dNTP-Mischung	2 mM pro Nukleotid	2 μL
MgCl ₂ -Lösung	25 mM	1,5 μL
Taq DNA-Polymerasepuffer	10-fach konzenriert	2 μL
dH ₂ O	-	10,3 μL
Taq DNA-Polymerase	5 U/μL	0,2 μL

Tabelle 3.2: Standardprogramm für die PCR.

Phase	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Denaturierung	90	95	1
Denaturierung	30	95	
Primeranlagerung	30	55	15-30
Elongation	120	72	
Elongation	600	72	1

3.1.2. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR stellt eine Alternative zur analytischen Restriktionsanalyse bei der Identifizierung von positiven Klonen dar. Bei der Kolonie-PCR können ohne eine vorhergehende DNA-Extraktion durch Verwendung entsprechender Primerkombinationen diejenigen *E.coli*-Klone identifiziert werden, die das gewünschte DNA-Insert in der korrekten Orientierung enthalten. Im Detail wurden 24 h nach dem Ausplattieren der transformierten Zellen auf LB-Agar 20-30 Kolonien von der Platte abgenommen und in je 10 μL dH₂O resuspendiert. Anschließend wurden 2 μL Zellsuspension als Template pro PCR-Reaktion eingesetzt. Die Zahl der Amplifikationszyklen betrug standardmäßig 30. Nach erfolgter PCR wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.1.3. Mutagenese-PCR

Die Herstellung einiger Substitutionsmutanten erfolgte mittels *Overlap-Extension-PCR*. Diese Methode ermöglicht die zielgerichtete Mutagenese einer DNA-Zielsequenz (Aiyar et al., 1996). In Abbildung 3.1 ist das Prinzip der *Overlap-Extension-PCR* schematisch dargestellt. Diese Methode erfordert zwei PCR-Amplifikationsreaktionen mit insgesamt vier verschiedenen Primern (a, b, c, d). In einem ersten Schritt erfolgt, getrennt voneinander, die Amplifikation von zwei sich überlappenden DNA-Fragmenten, durch Verwendung der

Primerpaare a+b und c+d. Zusammen umfassen beide Fragmente die gesamte Zielsequenz. Die Primer c und b sind komplementär zueinander und führen die gewünschte Mutation in die DNA-Zielsequenz ein (mit + gekennzeichnet). In einem nachfolgenden Schritt erfolgt die Amplifikation der DNA-Zielsequenz durch Verwenden beider DNA-Fragmente als PCR-Template (PCR#2)

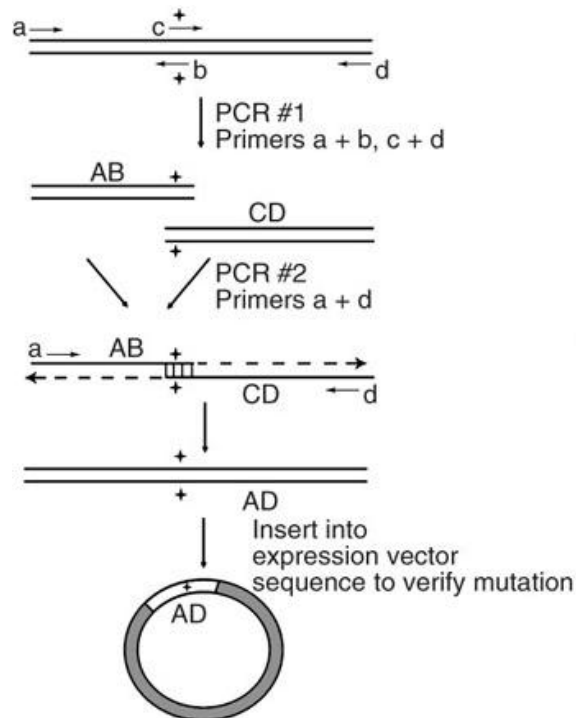


Abbildung 3.1: Zielgerichtete Mutagenese mittels *Overlap-Extension-PCR*. Erklärung siehe Text. Abbildung nach (Heckman und Pease, 2007)

Die Klonierung des Expressionsplasmides pIRES-Vif (L145A) erfolgte durch die *Overlap-Extension-PCR* Technik unter Verwendung der gelisteten Primerpaare und dem Plasmid pIRES-Vif (wt) als PCR-Template. Im Anschluss an die erste PCR-Reaktion (PCR#1) wurden die PCR-produkte mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Gleiche Mengen beider DNA-Fragmente wurden vereinigt und als PCR-Template für PCR#2 verwendet. Die amplifizierte DNA-Zielsequenz wurde zunächst ebenfalls geelektrophoretisch aufgetrennt und dann aus dem Gel isoliert. Nachfolgend wurde die aufgereinigte DNA über ClaI und BamHI in den Vektor pIRESpuro eingefügt. Das Vorhandensein der eingeführten

Mutationen wurde durch DNA-Sequenzanalysen bestätigt. Sowohl PCR#1 als auch PCR#2 erfolgten nach den Angaben für eine Standard-PCR.

3.1.4. DNA-Sequenzierung

Alle klonierten Expressionskonstrukte wurden einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Sequenzierung erfolgte mit dem *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* der Firma Applied Biosystems. Für die Sequenzierung der auf pIRESpuro basierenden Konstrukte dienten in der Regel die Primer pIRES fwd und pIRES rev, welche vor bzw. hinter der Multiklonierungsstelle binden. Des Weiteren wurden auch die für die Klonierung verwendeten Primer als Sequenzierprimer genutzt. Für die Sequenzierung wurden DNA eingesetzt, die sowohl mittels der MiniPrep als auch MaxiPrep-Methode aufgereinigt worden war. Im Fall der mittels MiniPrep-Methode extrahierten DNA wurden die Proben vor Überführung in den Sequenzieransatz für 5 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert, um etwaige solide Verunreinigungen zu pelletieren. Es wurde stets die gesamte proteinkodierende Sequenz eines Expressionsvektors sequenziert. Das Auslesen der Sequenzen erfolgte im Haus durch das diagnostische Labor unter Leitung von Dr. B. Weißbrich mit dem *ABI Prism 3100 Analyzer* der Firma Applied Biosystems. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit den entsprechenden Standardsequenzen am Computer abgeglichen.

Tabelle 3.3: Standardreaktionsansatz für eine Sequenzierung.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
DNA-Probe	0,1 mg DNA/mL (optional)	2 µL
Sequenzierungspuffer	5-fach-konzentriert	1 µL
BigDye Reaktionsmix	2,5-fach-konzentriert	1 µL
Sequenzierungsprimer	5 pmol/µL	1 µL

Tabelle 3.4: Standardprogramm für die Sequenzierungs-PCR.

Schritt	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Denaturierung	10	96	25
Primerbindung	5	50	
Elongation	240	60	

3.1.5. Hybridisierung von Oligonukleotiden

In den Fällen, in denen eine PCR-Amplifikation eines DNA-Fragmentes wegen seiner geringen Länge nicht möglich war, wurde auf synthetische DNA-Sequenzen zurückgegriffen. Eine einfache Methode, synthetische DNA-Sequenzen zu generieren, ist die Hybridisierung komplementärer Einzelstrang-Oligonukleotide. In der vorliegenden Arbeit wurde der GS-Linker auf diese Weise hergestellt. Tabelle 3.5 zeigt den Standardansatz einer Hybridisierungsreaktion.

Tabelle 3.5: Standardansatz pro Hybridisierungsreaktion.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
Oligonukleotid fwd	5 nmoL/ μ L	2 μ L
Oligonukleotid rev	5 nmoL/ μ L	2 μ L
Taq-DNA- Polymerasepuffer	10-fach-konzentriert	2 μ L
dH ₂ O	-	ad 20 μ L

Zur Hybridisierung wurde der Reaktionsansatz auf 95°C im PCR-Thermozykler erhitzt und für 5 min bei dieser Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur bei einer Rate von 0,02°C/sec auf 30°C abgesenkt. Von dem hybridisierten Oligonukleotid wurden 15 ng in der Ligation eingesetzt.

3.1.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Analyse und Reinigung von PCR-Produkten sowie verdauter DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese im Flachbettformat. Bei dieser Methode wird DNA in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Die Auftrennung wurde durchweg mit 1,2% (w/v) Agarosegelen durchgeführt. Zur Herstellung der Gele wurden 1,2 g Agarose in 100 mL 1-fach konzentriertem TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt und mit 10 μ L einer 1% (w/v) Ethidiumbromidlösung versetzt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Abs._{max} 302/366 nm, Em._{max} 590 nm), der in Doppelstrang-DNA interkaliert und zur Visualisierung von DNA in Agarosegelen eingesetzt wird. Vor Auftrennung wurden die zu analysierenden Proben mit 6x DNA-Probenladepuffer (DLP) im Verhältnis 1:1 gemischt und zusammen mit dem HindIII sowie PstI DNA-Längenstandard aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde in 1-fach-konzentriertem TAE-Puffer bei einer Stromspannung ca. 5 V/cm und einer maximalen Stromstärke von 200 mA durchgeführt.

3.1.7. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden bei Belichtung mit UV-Licht (345 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des *GenElute Gel Extraction Kits* der Firma Sigma-Aldrich nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Wesentlicher Bestandteil des besagten Kits sind Chromatographiesäulen mit Kieselgel als fester Phase, die eine säulenchromatographische Aufreinigung von DNA Fragmenten erlauben. Die Elution der säulengebundenen DNA erfolgte mit 50-40 µL dH₂O. Nach jeder Extraktion wurde die Konzentration an eluierter DNA photometrisch bestimmt. Bei nicht unmittelbarer Verwendung wurden die DNA-Extrakte bei -20°C gelagert

3.1.8. Restriktion von DNA

Der Verdau von Plasmid-DNA und PCR-Amplifikaten erfolgte mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II, die ausnahmslos von der Firma Fermentas bezogen wurden. Beim Verdau wurden die ebenfalls von Fermentas erworbenen Restriktionspuffer verwendet und die empfohlenen Reaktionsbedingungen beachtet. Bei gleichzeitigem Verdau von DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurde der vorgeschlagene Puffer verwendet. Gab es keinen einzelnen Puffer, der bei der gegebenen Enzymkombination die optimale Enzymaktivität gewährleistete, so wurden die Verdaue direkt nacheinander durchgeführt. Nach erfolgtem DNA-Verdau wurden die Restriktionsendonukleasen gemäß den Herstellerangaben durch Erhitzen inaktiviert. Zur Analyse sowie präparativen Gewinnung wurden die DNA-Verdaue mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

3.1.9. DNA-Dephosphorylierung

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Dephosphorylierung von verdauter Plasmid-DNA stets die Antarctic Phosphatase und der dazugehörigen Reaktionspuffer von der Firma NEB benutzt. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde der Reaktionsansatz für 15 min bei 65°C erhitzt. Die dephosphorylierte DNA wurde ohne weitere Aufarbeitung für die Ligation verwendet.

Tabelle 3.6: Standardreaktionsansatz der DNA-Dephosphorylierung.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
DNA	n/a	max. 7 µL
Reaktionspuffer	10-fach-konzentriert	1 µL
Antarctic Phosphatase	5 U/µL	0,15 µL
dH ₂ O	-	ad 10 µL

Die Dephosphorylierung erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur.

3.1.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation wird ein entsprechend prozessiertes DNA-Fragment in einem ATP-abhängigen enzymkatalysierten Schritt in einen Vektor eingefügt. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Ligationen mit der T4-DNA Ligase und dem dazugehörigen Ligationspuffer der Firma Fermentas durchgeführt. Zur Erhöhung der Ausbeute an gewünschtem Ligationsprodukt, erfolgten die Ligationen mit einem Insert-DNA zu Vektor-DNA Verhältnis von 3:1. In Tabelle 3.7 ist der Standardreaktionsansatz angegeben. Im Anschluss an die Ligation wurden chemisch kompetente *E.coli*-Zellen mit den Ligationsansätzen transformiert.

Tabelle 3.7: Standardreaktionsansatz für eine Ligation.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
DNA (Vektor-DNA + Insert-DNA)	n/a	max. 10 µL
Ligationspuffer	10-fach-konzentriert	2 µL
T4 DNA-Ligase	5 U (Weiss) /µL	0,5 µL
ddH ₂ O	-	ad 20 µL

Die Ligationsreaktion erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur.

3.1.11. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Da unbehandelte *E.coli*-Zellen nur in sehr geringem Maße in der Lage sind, DNA von außen aufzunehmen, müssen diese kompetent gemacht werden. Routinemäßig wird die CaCl₂/RbCl₂-Methode zur Erhöhung der Kompetenz von *E.coli*-Zellen eingesetzt. Als erste Schritte bei der Herstellung von chemisch-kompetenter Zellen wurden 1 mL einer Übernachtskultur eines entsprechenden *E. coli* Stammes in 100 mL antibiotikafreies LB-Medium überführt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,2-0,3 bei 37°C und 200 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in Zentrifugationsgefäße überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen bei 4°C und 2500 rpm für

10 min pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 40 mL eiskaltem Transformationspuffer II resuspendiert und die Zellen abermals bei 4°C und 2500 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen in 4 mL eiskaltem Transformationspuffer III aufgenommen und für 15 min auf Eis belassen. Im Anschluss wurden je 500 µL der Bakteriensuspension in Kryoröhrchen überführt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C. Um die Kompetenz der Zellen festzustellen, wurde ein Aliquot aufgetaut und dieses entsprechend dem Transformationsprotokoll mit verschiedenen Mengen (0,1; 1; 10 und 100 ng) an pUC18 transformiert. Die Kompetenz, angegeben in CFU/ng DNA, ergab sich aus der Anzahl der auf dem Ampicillin-haltigen LB-Agar gewachsenen Kolonien.

3.1.12. DNA-Transformation

Das Einbringen der DNA-Konstrukte erfolgte durch Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mittels der Hitzeschockmethode. Zur Transformation wurden zunächst die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit gleichem Volumen an eiskaltem Transformationspuffer gemischt. Nachfolgend erfolgte die Zugabe von 10 µL Ligationsansatz oder alternativ 100 ng Plasmid-DNA zu 200 µL Bakteriensuspension. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 42 sec bei 42°C und eine nachfolgende Inkubation auf Eis für 5 min. Anschließend wurden dem Ansatz 800 µL LB-Medium zugegeben, und es wurde für 60 min bei 37°C und 200 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Danach wurden die transformierten Zellen für 5 min bei 5000 rpm pelletiert, und der Überstand bis auf 200 µL abgenommen. Die pelletierten Zellen wurden dann im verbliebende Mediumrest resuspendiert, und die Suspension auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und für 16-18 h bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Analyse wurden Einzelkolonien in 2 mL Antibiotika-haltigem LB-Medium überführt und für 16-18 h bei 37°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert.

3.1.13. Isolierung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab (Mini-Prep)

Die Isolierung der Plasmid-DNA im Mini-Maßstab basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Als Ausgangsmaterial für die Plasmid-Isolierung dienten die 2 mL LB-Bakterienkulturen, die im Anschluss an die Transformation angesetzt wurden. Zur Extraktion der Plasmid-DNA wurden 1,5 mL Bakteriensuspension für 1 min bei 8000 rpm und

Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach Abnahmen des Überstandes wurden die pelletierten Zellen in 0,1 mL Resuspensionspuffer gelöst und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,2 mL Bakterienlysepuffer. Nach mehrmaligem vorsichtigen Mischen wurden dem Lysat 0,1 mL einer 5 M Kaliumacetat-Lösung (pH 5,2) zugegeben. Es wurde erneut mehrmals vorsichtig gemischt und anschließend für 10 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 0,25 mL 100% Isopropanol versetzt, gründlich gemischt und für 10 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und zur Entfernung von Verunreinigungen das DNA-Pellet mit Ethanol gewaschen. Dazu wurde das Pellet mit 0,25 mL 70% Ethanol (eiskalt) überschichtet und es wurde erneut für 10 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 0,04 mL 1-fach-konzentriertem TE-Puffer aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Plasmidisolate bei -20°C gelagert.

3.1.14. Isolierung von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab (Maxi-Prep)

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden zunächst die mit dem gewünschten Plasmid transformierten *E. coli*-Kulturen expandiert. Dazu wurden 0,2-0,5 mL der jeweiligen *E. coli*-Suspension in 300 mL LB- Medium überführt und für 16-18 h bei 37°C und 200 rpm auf einem horizontalen Schüttler inkubiert. Als Inoculum diente entweder die nicht verwendete Bakteriensuspension aus der Mini-Plasmidisolierung oder eine Kryokultur. Falls notwendig, wurde unmittelbar nach erfolgter Zellexpansion etwa 1 mL der Bakteriensuspension für die Herstellung einer Kryokultur abgenommen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mittels des *Plasmid DNA Purification Kit: NucleoBond PC500* der Firma Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers. Nach Elution und Präzipitation der Plasmid-DNA wurde diese bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen getrocknet und in 0,1-0,2 mL sterilem 1-fach-konzentriertem TE-Puffer aufgenommen. Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration wurden die Plasmidisolate mit sterilem 1-fach-konzentriertem TE-Puffer auf eine DNA-Endkonzentration von 1 mg/mL eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.1.15. Photometrische DNA-Bestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch die Messung der Absorption bei 260 nm. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA pro mL. Zur Überprüfung der Reinheit der DNA-Proben wurde zusätzlich noch die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt und der Quotient 260nm/280nm errechnet. In Hinblick auf die Reinheit gilt ein Quotient von 1,8 bis 2,0 als ideal. Werte größer als 2,0 deuten auf eine Kontamination mit RNA und Werte kleiner als 1,8 auf eine Verschmutzung mit Proteinen hin. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration mussten die Proben meist verdünnt werden. Die Verdünnung erfolgte immer mit dem jeweiligen Puffer, in dem die Probe gelöst war. Alle Messungen wurden gegen einen Leerwert durchgeführt, der aus dem jeweiligen Probenverdünnungspuffer bestand.

3.1.16. Kryokonservierung von *E. coli*-Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden 0,8 mL der entsprechenden *E. coli*-Kultur mit 0,2 mL sterilfiltriertem 80% (w/v) Glycerol vermischt und in sterile Schraubdeckelgefäße für die Kryokonservierung überführt. Die Lagerung der Kryokulturen erfolgte bei -80°C.

3.1.17. Ethanolpräzipitation von Plasmid-DNA

Zur Reinigung und Sterilisation der für die Herstellung der 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}-Zelllinie benötigten Plasmid-DNA, wurde die Ethanolfällung eingesetzt. Dazu wurden zum hitzeinaktivierten Restriktionsansatz 6 µL 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,2) zugeben und gründlich gemischt. Nachfolgend wurden 130 µL 100% Ethanol zugegeben und die Lösung für 5-10 min bei -80°C inkubiert. Zur Abtrennung der DNA wurde für 10 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 500 µL an 70% Ethanol zugegeben und es wurde erneut für 2 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 40 µL 1-fach konzentriertem sterilen TE-Puffer gelöst und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

3.1.18. Isolierung von genomischer DNA aus Mammalierzellen

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden 2×10^6 Zellen bei 2000 rpm für 5 min sedimentiert und das Pellet zweimal mit 500 µL PBS gewaschen. Anschließend wurde das

Pellet in 500 μ L Zelllyse-Puffer (ZLP) resuspendiert und die Zellsuspension für 5 min bei 60°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 2,5 μ L ProteinaseK (18 mg/mL) sowie 1 μ L RNaseA (10 mg/mL) und eine Inkubation für 3 h bei 60°C. Nachfolgend wurden 250 μ L 5 M NaCl zugesetzt, für 5min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 2-8°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit gleichem Volumen an Isopropanol gemischt und die Lösung für 60 min bei -20°C inkubiert. Zum Abtrennen der DNA wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet zweimal mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurden die DNA in 20 μ L 1x TE Puffer gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Kultivierung adhärenter Mammalierzellen

Die Anzucht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten HEK293T- und HeLa-Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in DMEM-Vollmedium bei 37°C und 5% CO₂ in 75 cm² und 175 cm² Kulturflaschen. Das Kulturvolumen für eine 75 cm² Kulturflaschen betrug 20 mL und für eine 175 cm² Kulturflaschen 50 mL. Zur Passagierung wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Entfernen der Waschlösung wurden 0,03 mL/cm² ATV-Lösung auf die Zellen gegeben und so lange bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich alle Zellen abgelöst hatten. Zum Abstoppen der Trypsinaktivität wurde den abgelösten Zellen 0,04 mL/cm² Medium zugegeben und diese darin resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen 1:5 oder 1:10 mit Medium verdünnt und ausgesät. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage. Falls die Zellen für weiterführende Versuche benutzt werden sollten, wurde deren Konzentration nach dem Ablösen mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Menge ausgesät.

3.2.2. Kultivierung der stabilen Zelllinien

Die Kultivierung der 293T^{Vif Tet-Off EYFP-A3G} als auch 293T^{ODD-SBFP2} Zellen erfolgte generell in Abwesenheit von Doxycyclin und die der HeLa^{DsRED Tet-Off} Zellen in Anwesenheit von 10 ng/mL Doxycyclin. Die Zellpassagierung wurde gemäß den Angaben unter Punkt 3.2.1. durchgeführt.

3.2.3. Langzeitlagerung von Mammalierzellen

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen wie unter Punkt 3.2.1. beschrieben abgelöst und die erhaltene Zellsuspension bei 500 rpm für 5 min bei 2-8°C zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die pelletierten Zellen in 1 mL sterilfiltriertem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann in einer Styroporbox auf -80°C heruntergekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Kryokulturen nach Entnahme aus dem Stickstoffbehälter in einem 37°C warmen Wasserbad vollständig aufgetaut und anschließend sofort mit 10 mL an warmen DMEM-Vollmedium verdünnt. Es folgte eine Zentrifugation bei 500 rpm für 5 min bei Raumtemperatur. Der DMSO-haltige Überstand wurde abgenommen und die Zellen in frischem DMEM-Vollmedium resuspendiert und ausgesät.

3.2.4. Fixierung von Zellen für die Mikroskopie

Zur Immobilisierung von Zellen auf einem Objektträger wurde die Paraformaldehyd-Methode angewendet. Vor der Fixierung wurden die gewünschten Zellen auf dem Lab-TekII 8er-Multiwellobjektträger der Firma Nunc ausgesät. Nach entsprechender Kultivierungszeit wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit je 400 µL PBS pro Vertiefung gewaschen. Nach Entfernen der Waschlösung erfolgte die Zugabe von 200 µL einer 4% (w/v) Formaldehydlösung pro Vertiefung, mit anschließender Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Paraformaldehyd abgenommen und die Zellen zweimal mit je 400 µL PBS pro Vertiefung gewaschen. Danach wurden die Zellen mit dem *Fluorescence Mounting Medium* der Firma DakoCytomation überschichtet und ein Deckglas aufgelegt. Die Lagerung der fixierten Zellen erfolgte bei 2-8°C.

3.2.5. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Zur Analyse von Zellen mittels FACS wurden diese erst mit PBS gewaschen, dann mit ATV-Lösung abgelöst und 1-2 mL der Suspension in FACS-Röhrchen überführt, in denen 3 mL einer 1:1 Mischung aus DMEM-Vollmedium und Versene vorgelegt war. Anschließend wurden die Zellen bei 500 rpm und 2-8°C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde bis auf 0,5 mL abgenommen und die Zellen darin resuspendiert. Bis zur Analyse wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert. Zur Auswertung der FCAS-Daten wurde das Programm FlowJo der Firma Tree Star verwendet.

3.2.6. Transiente Transfektion

Alle Transfektionen wurden mit dem kationischen Polymer Polyethylenimin (PEI) durchgeführt (Boussif et al., 1995). Durch ionische Wechselwirkung bildet PEI mit DNA Komplexe aus, die eine positive Nettoladung aufweisen. Diese Komplexe interagieren mit der Zellmembran und werden über Endozytose in die Zelle aufgenommen (Godbey et al., 1999).

Die transienten Transfektion der Zellen erfolgte 24 h nach deren Aussaat. Wenn nicht anders angegeben, wurden die transienten Transfektionen wie folgt durchgeführt: Im ersten Schritt wurde die Plasmid-DNA mit serumfreier *Hanks' balanced salt*-Lösung oder MEM verdünnt (0,02-0,03 µg DNA/mL) und gründlich gemischt. Nachfolgend wurde PEI mit einem Molekulargewicht von 25 kDa im Verhältnis 2:1 (µg PEI: µg DNA) zugegeben, sofort gründlich gemischt und der Transfektionsansatz für 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden entsprechende Mengen (100 µL je Vertiefung einer 6-Well Kulturplatte, 50 µL je Vertiefung einer 12-Well Kulturplatte, 25 µL je Vertiefung einer 24-Well Kulturplatte, 10 µL je Vertiefung einer 48-Well Kulturplatte) des Transfektionsansatzes zu den Zellen gegeben und diese weiterkultiviert. 18-24 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Zur weiteren Untersuchung wurden die Zellen zu definierten Zeitpunkten geerntet und mittels der entsprechenden Methoden analysiert.

Aussaat von HEK293T-Zellen in Multiwellplatten für die transiente Transfektion

0,5 x 10⁶ Zellen / Vertiefung einer 6-Well Kulturplatte / 2,5 mL DMEM-Vollmedium

0,25 x 10⁶ Zellen / Vertiefung einer 12-Well Kulturplatte / 1 mL DMEM-Vollmedium

0,125 x 10⁶ Zellen / Vertiefung einer 24-Well Kulturplatte / 0,5 mL DMEM-Vollmedium

0,05 x 10⁶ Zellen / Vertiefung einer 48-Well Kulturplatte / 0,25 mL DMEM-Vollmedium

3.2.7. BiFC-Assay im 96-Well Format

Zur Durchführung des BiFC-Assays im 96-Well Format wurden 15000 HEK293T-Zellen pro Vertiefung einer 96-Well Kulturplatte in 100 µL DMEM-Vollmedium ausgesät. Die transiente Transfektion der Zellen erfolgte 24 h nach Zellaussaat durch Zugabe von 10 µL Transfektionsansatz (Tabelle 3.8) pro Vertiefung. Nach 48 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgenommen und die Zellen in 150 µL Screeningpuffer pro Vertiefung resuspendiert. Nachfolgend wurden 120 µL der Zellsuspension zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensität auf eine schwarze 96-Well Platte übertragen und mit dem Fluorometer Safire2 analysiert. Die

Geräteeinstellungen bei der fluorometrischen Messung waren identisch mit den Angaben für EYFP-A3G in Tabelle 3.9.

Tabelle 3.8: BiFC-Transfektionsansatz

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
pIRES-NVenus-GS-EloC	1 µg/µL	1,5 µL
pIRES-CVenus-LL-Vif 138-192 wt bzw. L145A	1 µg/µL	1,5 µL
pDsREDmonomer	1 µg/µL	0,25 µL
PEI	1 µg/µL	6,5 µL
<i>Hanks'balanced salt</i> -Lösung	-	100µL

Nach der Zugabe von PEI wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss der Ansatz mit 200 µL *Hanks'balanced salt*-Lösung verdünnt.

3.2.8. Herstellung der 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}-Zelllinie

Zur Herstellung der 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}-Zelllinie wurden 1×10^6 HEK293T-Zellen auf eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 8,5 cm in 10 mL DMEM-Vollmedium ausgesät und für ca. 18 h kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen mit pTTT-Vif Virus transduziert (zur Herstellung siehe Punkt 3.3.2.). Dazu wurden 0,3 mL an 10-fach konzentriertem Virusüberstand in 10 mL DMEM-Vollmedium verdünnt und gegen das Aussaatmedium ausgetauscht. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen anschließend mit linearisiertem pIRES-EYFP-LL-A3G Expressionsplasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde mit der Selektion auf EYFP-A3G positive Zellen begonnen. Dazu wurde das alte Kulturmedium gegen mit Puromycin versetztes DMEM-Vollmedium mit einer Puromycin-Endkonzentration von 0,4 µg/mL ausgetauscht. Bis zur Isolierung des Einzelzellklons wurde der Selektionsdruck aufrechterhalten. Mediumwechsel erfolgten in der Regel alle 3 Tage. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Schale mit nicht transfizierten Zellen mitgeführt. Nach Absterben aller Puromycin-sensitiver Zellen wurden die EYFP-LL-A3G positiven Zellen auf eine neue 8,5 cm Zellkulturschale überführt und bis zur Konfluenz weiter kultiviert. Danach wurden diese abgelöst und ein Teil in Abwesenheit und ein Teil in Gegenwart von 10 ng/mL Doxycyclin für weitere 24 h kultiviert. Im nachfolgenden Schritt wurden diejenigen Zellen mittels FACS isoliert, die auf die Anwesenheit von Doxycyclin mit einer Abnahme der EYFP-Fluoreszenz reagierten. Dazu wurden die Zellen abgelöst, in sterilem PBS suspendiert und größere Zellaggregate mittels Filtration durch ein 35 µm Nylonnetz entfernt. Die Zellsortierung wurde freundlicherweise durch Herr Linden mit dem FACS-Gerät Vantage der Firma BD durchgeführt. Nach Sortierung wurde die isolierte

Zellpopulation in Doxycyclin-freiem DMEM-Vollmedium expandiert. Zur Isolierung eines Einzelzellklons wurde die *high dilution cloning*-Methode angewendet. Dabei wurden 0,25 Zellen pro Vertiefung einer 24-Well Kulturplatte in je 0,5 mL DMEM-Vollmedium unter Zusatz von Puromycin (0,4 µg/mL) ausgesät und bis zum Erscheinen makroskopisch sichtbarer Zellkolonien weiter kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellkolonien abgelöst, auf eine 24-Well Kulturplatte überführt und bis zur Konfluenz weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellklone zu gleichen Teilen in zwei Vertiefungen einer 12-Well Kulturplatte bei einer Zellkonzentration von $0,25 \times 10^6$ pro 1 mL Medium ausgesät und für 48 h in Abwesenheit bzw. Gegenwart von 10 ng/mL Doxycyclin kultiviert. Es folgte die Quantifizierung der EYFP-Fluoreszenz mit Hilfe des FACS-Gerätes Calibur der Firma BD.

Herstellung des pIRES-EYFP-LL-A3G Transfektionsansatzes (Angaben für eine 8,5 cm Ø Zellkulturschale):

Es wurden 30 µL (entspricht 30 µg DNA) an linearisiertem Expressionsplasmid mit 910 µL MEM-Lösung vermischt und anschließend 60 µL einer PEI-Lösung (1 mg/mL) zügig hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach auf die Zellen gegeben.

Die Linearisierung von pIRES-EYFP-LL-A3G erfolgte mit der Restriktionsendonuklease Eam1105I (AhdI) nach den Standardbedingungen. Der Restriktionsansatz wurde nach dem Verdau hitzeinaktiviert und mittels Ethanolpräzipitation aufgereinigt.

3.2.9. Herstellung der HeLa^{DsREDmonomer TetOff}-Zelllinie

Die Herstellung der HeLa^{DsREDmonomer Tet-Off}-Zelllinie erfolgte durch Transduktion von HeLa-Zellen mit pTTT-DsREDmonomer Viruspartikeln (zur Herstellung siehe Punkt 3.3.2.) und anschließender FACS-Sortierung. Zu Beginn der Herstellung wurden 1×10^6 HeLa-Zellen auf eine 8,5 cm Zellkulturschale in 10 mL DMEM-Vollmedium ausgesät und über Nacht (ca. 18 h) weiterkultiviert. Anschließend wurde das Aussaatmedium durch 10 mL frisches Medium ausgetauscht, das mit 0,3 mL an 10-fach konzentriertem Virusüberstand versetzt war. Etwa 24 h nach der Transduktion wurde das virushaltige Medium gegen frisches ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Nachfolgend wurden die Zelle abgelöst und je 2×10^6 HeLa-Zellen auf zwei 75 cm² Kulturflasche überführt und in Abwesenheit bzw. Gegenwart von 10 µg/mL Doxycyclin für 72 h kultiviert. Danach wurden die Zellen abgelöst und diejenige

Zellpopulation mittels FACS-Technik isoliert, die bei Behandlung mit Doxycyclin einen Rückgang der DsREDmonomer Fluoreszenz zeigte. Die Zellsortierung wurde freundlicherweise durch Herr Linden mit dem FACS-Gerät Vantage der Firma BD durchgeführt. Im Anschluss an die FACS Sortierung wurden die isolierte Zellpopulation expandiert. Zur Isolierung der in dieser Arbeit verwendete HeLa^{DsREDmonomer Tet-Off} -Zelllinie waren insgesamt drei FACS-Sortierungen notwendig.

3.2.10. MTT-Assay

Die Bestimmung der Toxizität von niedermolekularen Substanzen erfolgte mittels MTT-Assay (Mosmann, 1983). Dieser ist ein einfacher kolorimetrischer zellulärer Test, der auf der intrazellulären Umsetzung des Tetrazolium-Salzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen beruht. Das gebildete Formazan fällt dabei in unlösliche Kristalle aus, die durch organische Lösungsmittel wieder in Lösung gebracht werden. Infolge der enzymatischen Umsetzung kommt es zu einem Farbumschlag von gelb (MTT) zu violett (Formazan). Über die Messung der Farbintensität kann demnach die Viabilität der Zellen bestimmt werden. Generell gilt, je höher die Konzentration an Formazan desto niedriger war der toxische Effekt der jeweiligen Testsubstanz auf die Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der MTT-Assay stets im 96 Well-Format durchgeführt. Es beziehen sich daher alle nachfolgenden Angaben auf eine Vertiefung einer 96-Well Kulturplatte. Nach erfolgter Inkubation der Zellen mit der jeweiligen niedermolekularen Testsubstanz in einem Gesamtvolumen von 200 µL Medium, wurden erst 100 µl davon abgenommen und zum verbliebenden Rest 50 µL an MTT Substratlösung hinzugegeben. Im Anschluss daran erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 1 h. Danach wurde das Medium abgenommen, und es wurden zur Solubilisierung der Formazankristalle 50 µL Extraktionslösung zugegeben. Nach etwa 10 minütiger Inkubation bei RT unter leichtem Schwenken erfolgte eine Extinktionsmessung bei 560 nm und 650 nm als Referenz. Bei der späteren Datenanalyse wurde der Referenzwert von eigentlichem Messwert subtrahiert und die Zellviabilität in Prozent dargestellt.

3.2.11. Substanzscreening

Alle der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen wurden in fester Form geliefert und bis zu ihrer Lösung bei 2-8°C unter Lichtabschluss gelagert. Für das Substanzscreening wurde von allen Substanzen eine Stammlösung mit 100% DMSO als Lösungsmittel hergestellt. Die Substanzkonzentration betrug 25-100 mg/mL. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -20°C unter Lichtabschluss. Vor Aufgabe der Substanzen auf die Zellen, wurden diese durch Verdünnung mit 100% DMSO auf die gewünschte Arbeitskonzentration gebracht. Anschließend wurden die Substanzarbeitslösungen 1:200 mit vorgewärmtem Medium verdünnt, was eine DMSO-Endkonzentration von 0,5% ergab (siehe Abb. 3.2).

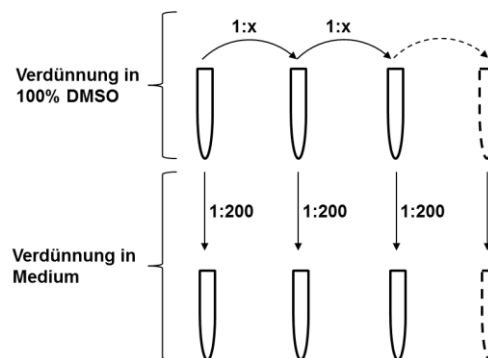


Abbildung 3.2: Herstellung der Arbeitslösungen.

Beim Substanzscreening im 96-Well Format wurde das mit den Substanzen versetzte Medium in eine sterile 96-Well Zellkulturplatte vorgelegt und schrittweise auf die bewachsene Platte überführt. Die Substanzarbeitslösungen wurden stets frisch angesetzt und nicht wiederverwendet.

Nach entsprechenden Einwirkzeiten wurden die Zellen geerntet und mit dem Fluorometer Safire2 der Firma Tecan bei den in Tabelle 3.9 angegebenen Geräteeinstellungen analysiert.

Tabelle 3.9: Geräteeinstellung bei der Fluoreszenzmessung am Safire2.

Geräteeinstellung	DsREDmonomer	ODDSBFP2	EYFP-A3G
Excitation wavelength	557 nm	380 nm	510 nm
Emission wavelength	585 nm	446 nm	535 nm
Excitation bandwidth	10 nm	10 nm	10 nm
Emission bandwidth	10 nm	10 nm	10 nm
Gain	optimal	optimal	optimal
Number of reads	10	10	10
FlashMode	High sensitivity	High sensitivity	High sensitivity
Integration time	40 µs	40 µs	40 µs
Lag time	0 µs	0 µs	0 µs
Plate definition file	GRE96fb	GRE96fb	GRE96fb
Z-Position (Manual)	7667 µm	7667 µm	7667 µm
Shake duration (Orbital High)	10 s	10 s	10 s
Shake settle time	5 s	5 s	5 s
Target Temperature	25 °C	25 °C	25 °C

3.2.12 Substanzscreening im 96-Well Format

Die 293T^{Vif Tet^{Off}/EYFP-A3G}-Zellen wurden 92 h vor dem Substanzscreening in Anwesenheit von 10 ng/mL Doxycyclin kultiviert. Zur Aussaat wurden alle drei stabilen Zelllinien einmal mit PBS gewaschen (0,3 mL/cm²) und dann mit ATV (0,03 mL/cm²) abgelöst. Zum Abstoppen der Trypsinaktivität wurde den abgelösten Zellen 0,04 mL/cm² DMEM-Vollmedium zugegeben. Im Falle der 293T^{Vif Tet-Off/EYFP-A3G} und HeLa^{DsREDmonomer Tet^{Off}}-Zellen war das Medium mit 0,1 ng/mL Doxycyclin versetzt. Nach dem Resuspendieren wurde die Zellzahl bestimmt und 15000 Zellen pro Vertiefung einer 96-Well Kultuplatte in einem Mediumvolumen von 100 µL ausgesät. Den 293T^{Vif Tet^{Off}/EYFP-A3G} und 293T^{ODD-SBFP2} Zellen wurden vor Aussaat 10% herkömmliche HeLa-Zellen beigemischt. Pro Vertiefung wurden in diesen Fällen 13500 Zelllinie-Zellen und 1500 HeLa-Zellen ausgesät. 24 h (HeLa^{DsREDmonomer Tet^{Off}}) bzw. 48 h (293T^{Vif Tet-Off/EYFP-A3G} und 293T^{ODD-SBFP2}) nach Aussaat wurden das Medium durch 200 µL Doxycyclin-freies, mit den Testsubstanzen versetztes DMEM-Vollmedium sowie den Kontrollen ausgetauscht. Beim Screening mit der 293T^{Vif Tet^{Off}/EYFP-A3G} sowie HeLa^{DsREDmonomer Tet^{Off}}-Zelllinie diente Doxycyclin-haltiges (0,1 ng/mL) und Doxycyclin-freies Medium mit einer DMSO-Endkonzentration von 0,5% als Kontrolle. Beim Screening mit der 293T^{ODD-SBFP2} – Zelllinie wurde Medium mit 0,2 µM MG132 und 0,5% DMSO als Kontrolle eingesetzt. Nach 24 h (293T^{Vif Tet-Off/EYFP-A3G} und 293T^{ODD-SBFP2}) bzw. 48 h (HeLa^{DsREDmonomer Tet^{Off}}) Inkubation mit den Testsubstanzen wurde das Medium abgesaugt und durch 150 µL Screeningpuffer pro Vertiefung ersetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen im Screeningpuffer resuspendiert und 120 µL der Suspension auf eine schwarze 96-

Well Platte übertragen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit dem Fluorometer Safire2 der Firma Tecan bei Raumtemperatur innerhalb einer Stunde nach dem Resuspendieren der Zellen in Screeningpuffer.

3.2.13 Arbeiten mit dem Multifluoreszenz-Assay

Das Substanzscreening mit dem Multifluoreszenz-Assay erfolgte im 48-Well Format. Vor Beginn des Screenings wurden die 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}-Zellen für 72 h in Anwesenheit von 10 ng/mL Doxycyclin kultiviert. Zur Aussaat wurden die 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G} als auch die 293T^{ODD-SBFP2} und HeLa^{DsREDmonomer TetOff}-Zellen einmal mit PBS gewaschen (0,3 mL/cm²) und dann mit ATV (0,03 mL/cm²) abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden dann in DMEM-Vollmedium mit 1 ng/mL Doxycyclin resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Nachfolgend wurden die Zellen im Verhältnis 2:1:1 (293T^{ODD-SBFP2}: HeLa^{DsREDmonomer TetOff}:293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}), bei einer Gesamtzellzahl von 220000/mL, gemischt und 250 µL dieser Zellsuspension auf je eine Vertiefung einer 48-Well Zellkulturplatte übertragen. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen. Dazu wurde das Aussaatmedium durch 350 µL Substanz-haltiges DMEM-Vollmedium ersetzt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Zur Analyse wurde das Medium entfernt und 150 µL Screeningpuffer pro Vertiefung zugegeben. Durch kräftiges Pipettieren wurden die Zellen resuspendiert und 120 µL der Suspension auf eine schwarze 96-Well Platte überführt. Die anschließende Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte mit dem Fluorometer Safire2 unter Berücksichtigung der in Tabelle 3.9. angegebenen Geräteeinstellungen.

3.3. Virologische Methoden

3.3.1 Herstellung VSV-G pseudotypisierter retroviraler Vektoren

Durch die Pseudotypisierung von lentiviralen Vektoren mit dem Oberflächenglykoprotein des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV-G), wird sowohl eine deutliche Erweiterung des Wirtstropismus als auch eine Erhöhung der Stabilität des Vektors erreicht (Burns et al., 1993). Mit VSV-G pseudotypisierte lentivirale Vektoren werden primär über Endozytose in die Zelle aufgenommen und nicht wie mit dem gp120/gp41-Komplex bestückte Partikel über eine Fusion mit der Zellmembran. Zur Herstellung der VSV-G pseudotypisierten lentiviralen Vektoren wurde im vorliegenden Fall ein Zwei- sowie ein Drei-Plasmid-System verwendet. Durch die Aufteilung des viralen Genoms auf mehrere Plasmide sowie die Deletion von für die Replikation essentiellen Genombereichen wird ein hohes Maß an Sicherheit beim Arbeiten mit

lentiviralen Vektoren erreicht. Die mittels Mehr-Plasmid-System generierten Vektoren sind zwar hochinfektiös, können aber nicht mehr replizieren.

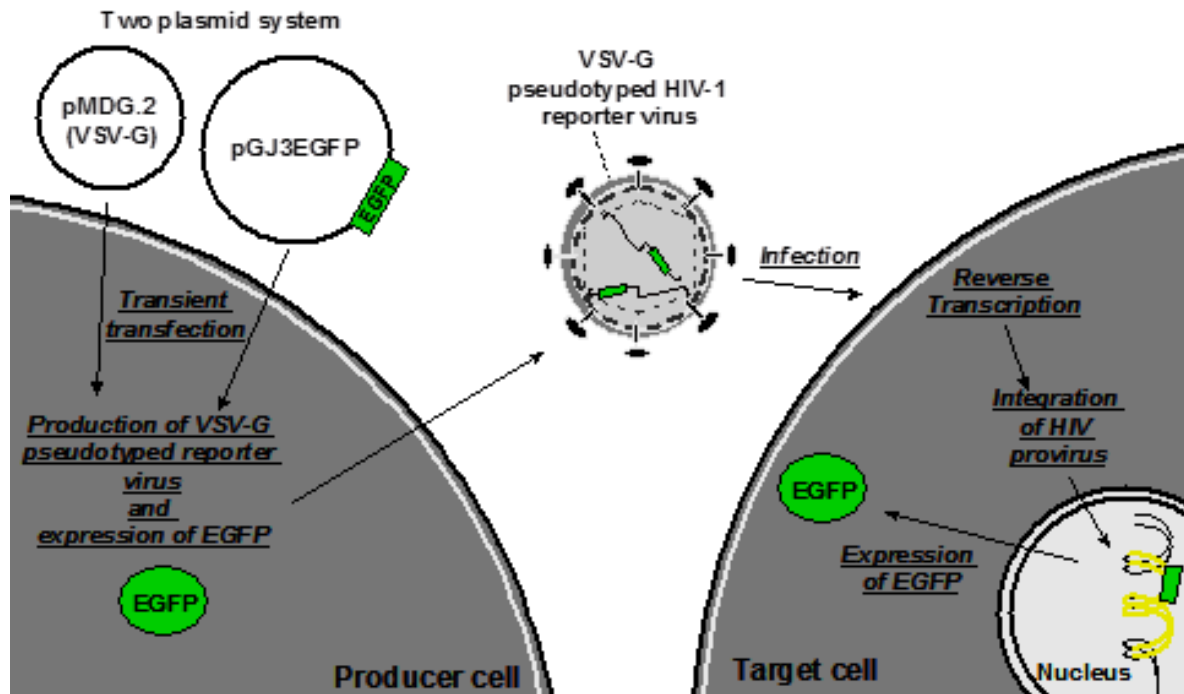


Abbildung 3.3: „Single round infectivity assay“ mit VSV-G pseudotypierten von HIV-1 abgeleitete virale Vektoren. Deren Herstellung erfolgte unter Verwendung des Zwei-Plasmid-Systems (pGJ3EGFP/pMD2.G).

3.3.2. Herstellung viraler Partikel mit dem Drei-Plasmid-System

Die Herstellung der pTTT-Vif und pTTT-DsRedmonomer Viren erfolgte mittels Drei-Plasmid-System (Dull et al., 1998). Dazu wurden 10×10^6 HEK293T-Zellen auf eine 175 cm^2 Zellkulturflasche in 40 mL DMEM-Vollmedium ausgesät und für 24 h kultiviert. Anschließend wurde der in Tabelle 3.10 aufgeführte Transfektionsansatz (4 mL) zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 18 h wurden die transfizierten Zellen für 6-8 h in Gegenwart von 10 mM Natriumbutyrat kultiviert und danach das Medium gegen frisches ausgetauscht. Die Virusernte erfolgte 48 h und 72 h nach der Transfektion. Beide Virusernten wurden anschließend vereint und Verunreinigungen wie Zelltrümmer mittels eines Spritzenfilter (Porenweite $0,45 \text{ }\mu\text{m}$) abgetrennt. Die Viruslösung wurde dann unter Verwendung der Ultrafiltrationseinheit Ultracel-100K von Millipore 10-fach aufkonzentriert. Der aufkonzentrierte Virusüberstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.10: Transfektionsansatz

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
psPAX2	1 µg/µL	12 µL
pMD2.G	1 µg/µL	5 µL
pTTT-Vif bzw. pTTT-DsREDmonomer	1 µg/µL	16 µL
PEI	1 µg/µL	90 µL
<i>Hanks' balanced salt</i> -Lösung oder MEM	-	ad 4 mL

3.3.3. Aufkonzentrierung von Viruspartikeln mittels Ultrazentrifugation

Zur Aufreinigung von Viruspartikeln für die Westernblot Analyse wurden 3 mL an 10-fach konzentriertem Virusüberstand in Ultrazentrifugationsröhrchen auf 1 mL 20% Sucrose geschichtet und für 1,5 h bei 275.000 x g und 4°C in einem TST60.4 Rotor (Sorvall) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt, das Pellet in 2x Probenedenaturierungspuffer (PDP) resuspendiert und die Suspension für 5 min bei 95°C denaturiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.3.4. Virustiterbestimmung

In der vorliegenden Arbeit wurde die antiretrovirale Aktivität von A3G in einem *single round infectivity assay* bestimmt (siehe Abb. 3.3). Dieser Assay umfasst als ersten Schritt die Produktion von viralen Partikeln in Gegenwart von A3G bzw. der Kontrolle. Im nachfolgenden Schritt werden die partikelhaltigen Überstände auf Zielzellen überführt. Die A3G-Aktivität ergibt sich dann aus der Menge an integriertem funktionellem Virusgenom, im vorliegenden Fall angezeigt durch die Expression von EGFP. Um eine Verfälschung der Ergebnisse, verursacht durch Schwankungen in der Menge an produzierten Viruspartikeln, zu vermeiden, wurde die Konzentration an Kapsidprotein (p24) in jeder Probe vor Überführung auf die Zielzellen mittels Dot-Blot Methode bestimmt. Die Konzentration an p24 gibt Auskunft über die Menge an viralen Partikeln im Zellkulturüberstand. Da jedoch auch nicht funktionelle Partikel durch diese Methode erfasst werden, lässt der p24-Wert keine Rückschlüsse über die Infektiosität der Partikel zu (Geraerts et al., 2006).

Zur Bestimmung der p24-Konzentration wurden im ersten Schritt gleiche Teile an virushaltigem Zellkulturüberstand und semi-dry blotting Puffer gemischt und für eine 1 h bei 37°C inkubiert. Ausgehend von dieser Lösung wurde dann eine Verdünnungsreihe mit 5 Verdünnungsstufen und einem Verdünnungsfaktor von 5 hergestellt. Als Diluent wurde

wiederum semi-dry blotting Puffer verwendet. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 5 x 1,5 µL auf einen unbehandelten Nitrocellulose-Membranstreifen (0,2 µm Porenweite) aufgetropft, auf dem zuvor die Auftropfposition markiert worden war. Zwischen jedem Auftropfen wurde so lange gewartet, bis die Membran getrocknet war. Von jeder Verdünnungsstufe erfolgte eine Doppelbestimmung. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung bei 2-8°C für 18-24 h in 5% TTBS-Milch unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach dem Blockieren wurde mit dem Primärantikörper (anti-p24; 1:2.000 in TTBS 5% Magermilch) für 1 h bei RT inkubiert und anschließend 3-mal je 5 min mit je 50 mL TTBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus-HRP; 1:5000 in TTBS-5% Magermilch) erfolgt ebenfalls 1 h bei RT. Nachfolgend wurde die Membran 3-mal je 5 min mit je 50 ml TTBS und abschließend 1-mal mit 50 ml TBS für 5 min gewaschen. Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgte unter Verwendung des *Western Blotting Luminol Reagent*-Kit der Firma Santa Cruz Biotechnology nach den Vorgaben des Herstellers. Die Peroxidase-reaktion wurde auf Röntgenfilm dokumentiert. Zur Quantifizierung der Dot-Intensitäten wurden die Röntgenfilme eingescannt und mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop vermessen.

3.3.5. Test zum Nachweis der antiviralen Aktivität von A3G

Zum Nachweis der antiviralen Aktivität von wildtypischen A3G und EYFP-A3G wurde ein Zwei-Plasmid-System bestehend aus dem Plasmid pGJ3EGFP (Transfer + Verpackung) und pMD2.G (VSV-G Expression) verwendet. Die Herstellung der viralen Partikel erfolgte in Gegenwart von wt APOBEC3G oder EYFP-A3G. Zur Herstellung von VSV-G pseudotypisierten Partikeln wurden 10×10^6 HEK293T-Zellen auf eine 175 cm^2 Zellkulturflasche in 40 mL DMEM-Vollmedium ausgesät und für 20 h bei 37°C bei 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem in Tabelle 3.11 angegebenen Transfektionsansatz transient transfiziert. Zur Erhöhung der Partikelausbeute wurden dem Medium 18 h nach der Transfektion 800 µL an 500 mM Natriumbutyrat-Lösung zugegeben (Merten, 2004). Nach Zugabe von Natriumbutyrat wurden die Zellen für weitere 6 h im Brutschrank inkubiert und anschließend das alte Kulturmedium durch frisches DMEM-Vollmedium ersetzt. 18 h nach der Butyrat-Induktion erfolgte die erste Virusernte durch Abnahmen des partikelhaltigen Kulturüberstandes. Dieser wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 2-8°C gelagert. Der abgenommene Überstand wurde durch frisches DMEM-Vollmedium ersetzt und die Zellen für weitere 18 h kultiviert. Anschließend erfolgte die zweite Virusernte. Beide Virusernten wurden vereinigt und Verunreinigungen wie Zelltrümmer mittels eines Spritzenfilters (Porenweite 0,45 µm) abgetrennt. Die Viruslösung wurde dann unter

Verwendung der Ultrafiltrationseinheit Ultracel-100K von Millipore 10-fach aufkonzentriert. Nachfolgend wurde der aufkonzentrierte Virusüberstand aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C gelagert.

Tabelle 3.11: Transfektionsansatz

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
pGJ3EGFP	1 µg/µL	63 µL
pMD2.G	1 µg/µL	18,5 µL
pIRES-ClaI-A3G/pIRESpuro	1 µg/µL	4,5/30,5; 11,5/23,5; 18,5/16,5 µL
pIRES-EYFP-A3G/pIRESpuro	1 µg/µL	4,5/30,5; 11,5/23,5; 18,5/16,5 µL
pIRESpuro (Mock)	1 µg/µL	35 µL
PEI	1 µg/µL	230 µL
MEM	-	ad 4 mL

3.4. Proteinbiochemische Methoden

3.4.1. Zellyse

Die Analyse der Transgenexpression in den entsprechenden Zellen machte deren Aufschluss notwendig. Zur Zellyse wurden die das Transgen exprimierenden Zellen einmal mit PBS gewaschen, dann mit Versene von der Kulturplatte abgelöst und durch Zentrifugation bei 2000 rpm und 2-8°C pelletiert. Anschließend wurden 3-4 x 10⁶ Zellen in 100 µl Zellaufschlusspuffer (ZAP) aufgenommen und für 5 -10 min auf Eis inkubiert. Zum Aufschluss der Zellen wurde die Zellsuspension mehrmals kräftig resuspendiert. Zwischen den Resuspendierungsschritten wurde die Zellsuspension für 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgtem Zellaufschluss wurde das Lysat bei 13000 rpm und 2-8°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Nachfolgend wurde der Überstand in eine neues Reaktionsgefäß überführt und wenn notwendig der Proteingehalt der Probe mittels Bradford-Methode bestimmt. Für die SDS-PAGE wurden die Lysate im Verhältnis 1:1 mit 2-fach konzentriertem Probendenaturierungspuffer (PDP) gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Lagerung der denaturierten Proben erfolgte bei -20°C.

3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Roti-Nanoquant Kit der Firma Carl Roth verwendet. Die Durchführung und Auswertung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Als Standardprotein diente Fraktion V Albumin.

3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Eine Analyse von Proteinen macht es oft notwendig, diese nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Die Auftrennung der Probenproteine wurde in einem 12%igen oder 17,5%igen Polyacrylamidgel durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von $0,5 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche und einer maximalen Stromspannung von 145 V in 1-fach konzentriertem SDS-Laufpuffer. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:1 mit 2-fach- konzentriertem Probedenaturierungspuffer (PDP) gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Zur Proteinanalyse wurden ca. 5-20 μL des denaturierten Lysates und 5 μl Proteinstandard aufgetragen.

Tabelle 3.12: Standardgelpräparation für ein 12%iges sowie 17,5%iges SDS-PAGE Gel.

Sammelgel 4%		
Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
Sammelgelpuffer	-	5 mL
ddH ₂ O	-	10 mL
Rotiphorese Gel 30	30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1	3 mL
APS	10% (w/v) in ddH ₂ O	260 μL
TEMED	100%	26 μL
Trenngel 12%		
Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
Trenngelpuffer	-	15 mL
ddH ₂ O	-	21 mL
Rotiphorese Gel 30	30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1	24 mL
APS	10% (w/v) in ddH ₂ O	450 μL
TEMED	100%	45 μL
Trenngel 17,5%		
Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen an Stammlösung
Trenngelpuffer	-	15 mL
ddH ₂ O	-	9,5 mL
Rotiphorese Gel 30	30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1	35 mL
APS	10% (w/v) in ddH ₂ O	450 μL
TEMED	100%	45 L

3.4.4. Western-Blot

Zur weiteren Analyse der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und durch geeignete Antikörper detektiert. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte durch das *semi-dry* Elektroblothingverfahren bei einer konstanten Stromstärke von ca. 2 mA/cm² Gelfläche und einer maximalen Stromspannung von 100 V für 90 min mit Western-Blot Transferpuffer.

Der Blot-Aufbau gestaltete sich wie folgt:



Nach dem Blotvorgang wurde die Nitrocellulosemembran in 25 mL Blockierungspuffer für 16-18 h bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nachfolgend wurde der Blockierungspuffer entfernt, die Membran einmal mit 25 mL TTBS-Puffer gewaschen und der mit Blockierungspuffer verdünnte Primärantikörper zugegeben. Anschließend wurde die Membran für 60-90 min unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Schritt wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran 3-mal für jeweils 5 min mit 25 mL TTBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe des ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnten Sekundärantikörpers wurde die Membran für weitere 60-90 min unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit je 25 mL TTBS-Puffer für je 5 min und nochmals zwei Waschschrte mit je 25 mL TBS-Puffer für je 5 min. Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgte unter Verwendung des *Western Blotting Luminol Reagent*-Kit der Firma Santa Cruz Biotechnology nach den Vorgaben des Herstellers. Die Peroxidasereaktion wurde auf Röntgenfilm dokumentiert.

4. Ergebnisse

Den Hauptteil dieser Arbeit umfasste die Entwicklung von fluoreszenzbasierten zellulären Testsystemen für die Identifizierung von niedermolekularen Inhibitoren des Vif induzierten A3G-Abbaus. Insgesamt konnte vier zelluläre Testsysteme für die Wirkstoffsuche etabliert werden, wobei drei dieser Testsysteme auf Reporterzelllinien basieren. Eine dieser Zelllinien, mit der Bezeichnung $293T^{\text{VifTetOff/EYFP-A3G}}$, erfasst den Vif induzierten proteasomalen Abbau von APOBEC3G. Ergänzt wird dieses Testsystem, im Folgenden auch als A3G-Abbauassay bezeichnet, durch zwei Zelllinien-basierte Kontrollsysteme, die eine Identifizierung von Wirkstoffen ermöglichen, welche falsch positive Signale im A3G-Abbauassays induzieren. Im Einzelnen sind dies die Zelllinien $293T^{\text{ODD-SBFP2}}$ und $\text{HeLa}^{\text{DsREDmonomer TetOff}}$. Gesondert von diesen Zelllinien-basierten Testsystemen wurde ein auf der BiFC-Technik beruhender zellulärer Assay zur direkten Analyse der Vif-ElonginC Interaktion entwickelt.

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung von Derivaten des A3G-Abbauinhibitors RN-18 und niedermolekularen Inhibitoren der Vif-ElonginC-Interaktion.

4.1. Etablierung der $293T^{\text{VifTetOff/EYFP-A3G}}$ -Zelllinie als A3G-Abbauassay

Es wurde eine HEK293T-Zelllinie etabliert, die sowohl ein EYFP markiertes APOBEC3G als auch HIV-1 Vif stabil ko-exprimiert. Die Expression des EYFP-A3G Fusionskonstrukts erfolgt konstitutiv, während die Expression von Vif unter der Kontrolle des Tet-Off-Expressionssystems (Gossen et al., 1992) steht, wodurch eine Regulierbarkeit der Vif-Expression und damit verbunden eine Kontrolle der APOBEC3G-Degradation erzielt wird. Bei induzierter Expression von Vif erfolgt der proteasomale Abbau des APOBEC3G-Fusionsproteins, wohingegen bei einer Suppression der Vif-Expression der Abbau ausbleibt. Änderungen im Abbaustatus von EYFP-A3G können anhand der EYFP-Fluoreszenz dargestellt werden. Der Aufbau und die Funktionsweise des Tet-Off-Expressionssystems als auch des A3G-Abbauassays sind nachfolgend in Abbildung 4.1 dargestellt.

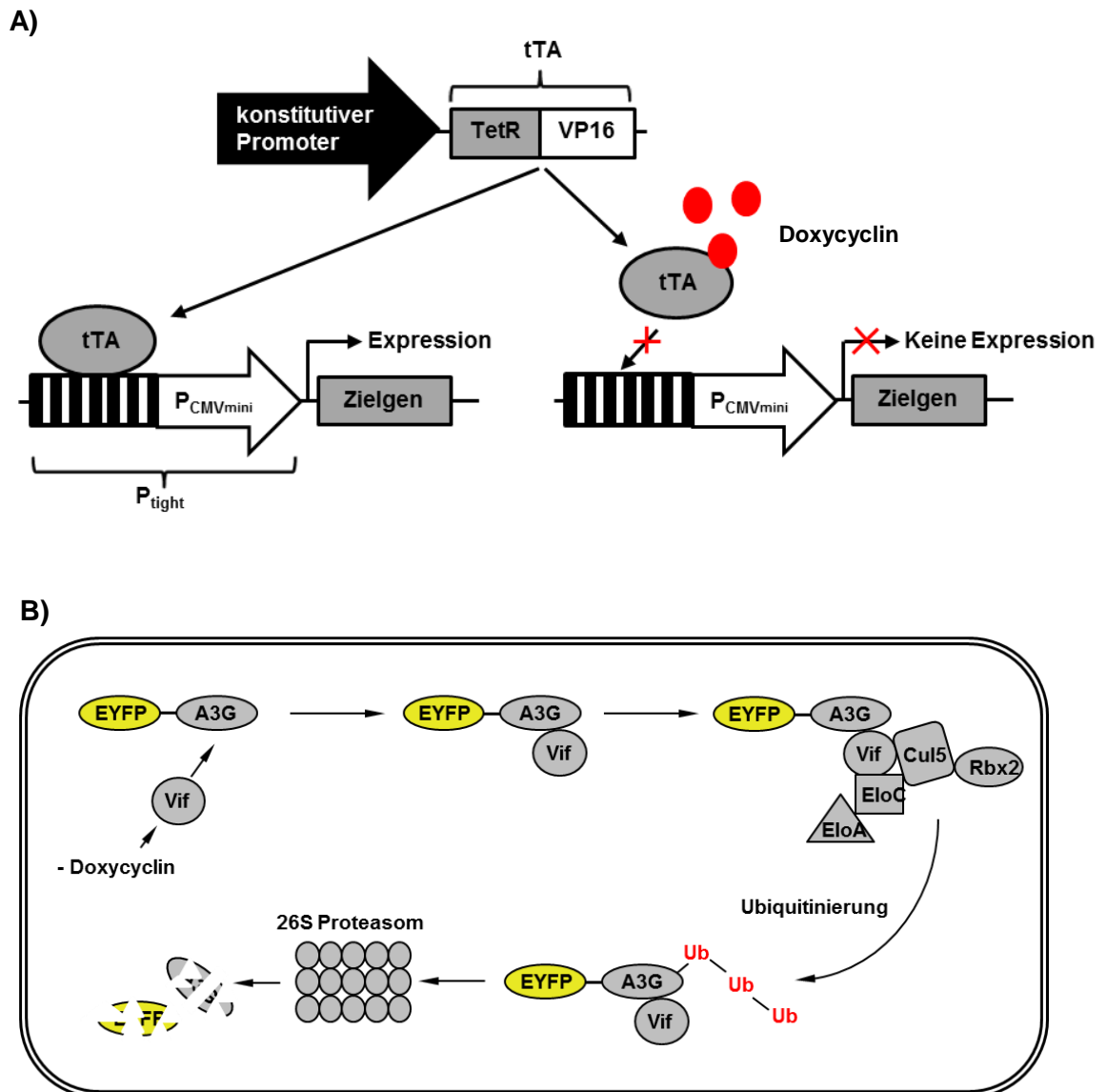


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Tet-Off-Expressionssystems (A) und des A3G-Abbauassays (B). Das Tet-Off Expressionssystem setzt sich aus zwei Funktionseinheiten zusammen, dem Tetracyclin bzw. Doxycyclin-abhängigen Transaktivator (tTA) und einem Hybridpromoter (P_{tight}), bestehend aus dem CMV-Minimalpromoter (P_{CMVmini}) und sieben Kopien des Tet-Operators. Beim Transaktivator handelt es sich um ein aus der Transaktivierungsdomäne VP16 des Herpes simplex Virus und dem bakteriellen Tet-Repressor (TetR) zusammengesetztes Fusionsprotein, das in Abwesenheit von Tetracyclin bzw. Doxycyclin an den Promoter P_{tight} bindet und dadurch die Expression des Zielgens induziert. In Anwesenheit von Tetracyclin bzw. Doxycyclin erfolgt keine Interaktion von tTA mit P_{tight} und die Zielgenexpression unterbleibt. Im Zusammenhang mit dem A3G-Abbauassay bewirkt Doxycyclin die Suppression der Vif-Expression und damit verbunden die Unterdrückung der EYFP-A3G Degradation. In Abwesenheit von Doxycyclin wird Vif exprimiert und es kommt zum Abbau von EYFP-A3G. Tet-Off Expressionssystem modifiziert nach Kohan, 2008.

4.1.1. Darstellung der Expressionskonstrukte

Die für die Etablierung des A3G-Abbauassays notwendigen Expressionskonstrukte sind in Abb. 4.2 dargestellt. Dies war zum einen ein auf dem Expressionsplasmid pIRESpuo basierender Vektor, der für ein N-terminal mit dem gelb fluoreszierenden Protein EYFP markiertes humanes APOBEC3G kodiert (pIRES-EYFP-LL-A3G). Zur Gewährleistung einer optimale intramolekularen Flexibilität des Fusionsproteins wurde ein 18 Aminosäuren langer Peptidlinker (Large Linker) zwischen EYFP und A3G eingefügt. Die hierfür verwendete Peptidbrücke wurde bereits anderswo zur Konstruktion von Fusionsproteinen eingesetzt (Kerppola, 2006). Als Ausgangsvektor für die Klonierung des TetOff-Vif-Expressionsvektors (pTTT-Vif, Abb 4.2 B) diente der von HIV-1 abgeleitete GFP-Reportergenvektor pWPXL.

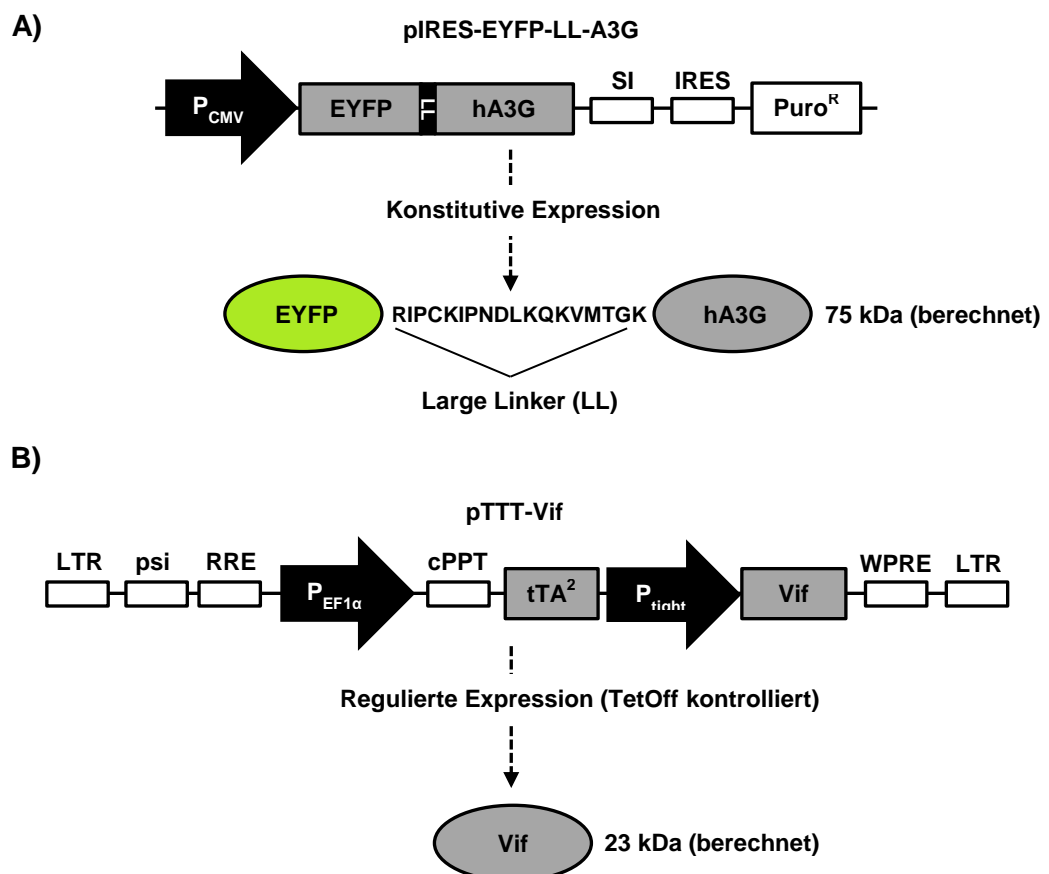


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der EYFP-A3G und Vif-Expressionskassette mit den entsprechenden Expressionsprodukten. (A) Konstrukt, welches für das EYFP-A3G Fusionsprotein kodiert. (B) Vif Tet-Off Expressionskonstrukt. $P_{EF1\alpha}$, Promoter des Elongationsfaktor 1 α ; tTA^2 , Tet Transaktivator; P_{tight} , tTA^2 responsiver Promoter; SI, synthetisches Intron, IRES, interne Ribosomen Bindungsstelle; Puro^R, Puromycin Resistenz; cPPT, central poly purine tract; LTR, long terminal repeat; WPRE, Woodchuck Hepatitis Regulierungselement; RRE, Rev responsive element; psi, Verpackungssignal; P_{CMV} , Promoter des Cytomegalie-Virus.

4.1.2. Funktionalitätskontrolle der Expressionskonstrukte

4.1.2.1. Charakterisierung des EYFP-A3G Konstrukts

Die Markierung von Zielproteinen mit großen Reporterproteinen kann zu einer Beeinträchtigung der wildtypischen Proteinfunktion führen, welche oftmals durch sterische Effekte verursacht wird. Zur Feststellung, ob die Markierung mit EYFP die Fähigkeit von Vif mit A3G zu interagieren beeinträchtigt, wurde EYFP-A3G mit der Wildtypform von Vif bzw. mit der A3G interaktionsdefizienten Vif-Doppelmutante H43A/Y44A (Russel et al., 2007) in HEK293T transient ko-exprimiert. Wie in Abbildung 4.3 A zu sehen ist, kam es in Anwesenheit von wt Vif im Vergleich zur Vif-Mutante zu einer 10-fachen Reduktion (Abb 4.3 A Fluorometer) der zellulären EYFP-A3G Konzentration bei gleichen Expressionsniveaus der Vif-Proteine (Abb 4.3 A WB).

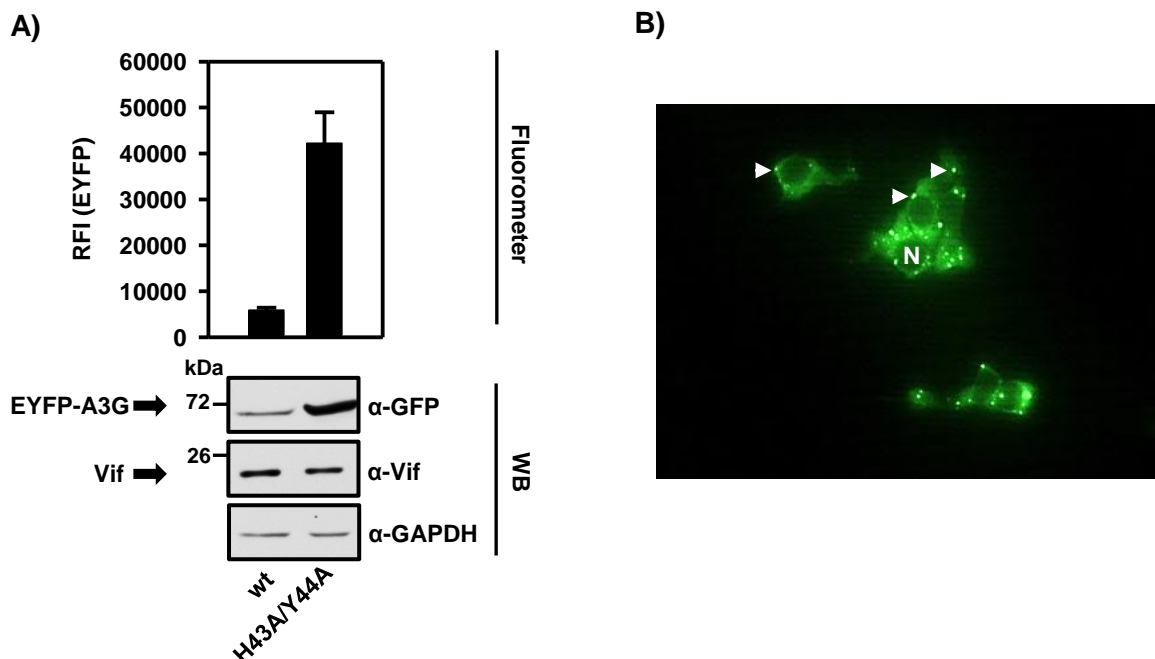
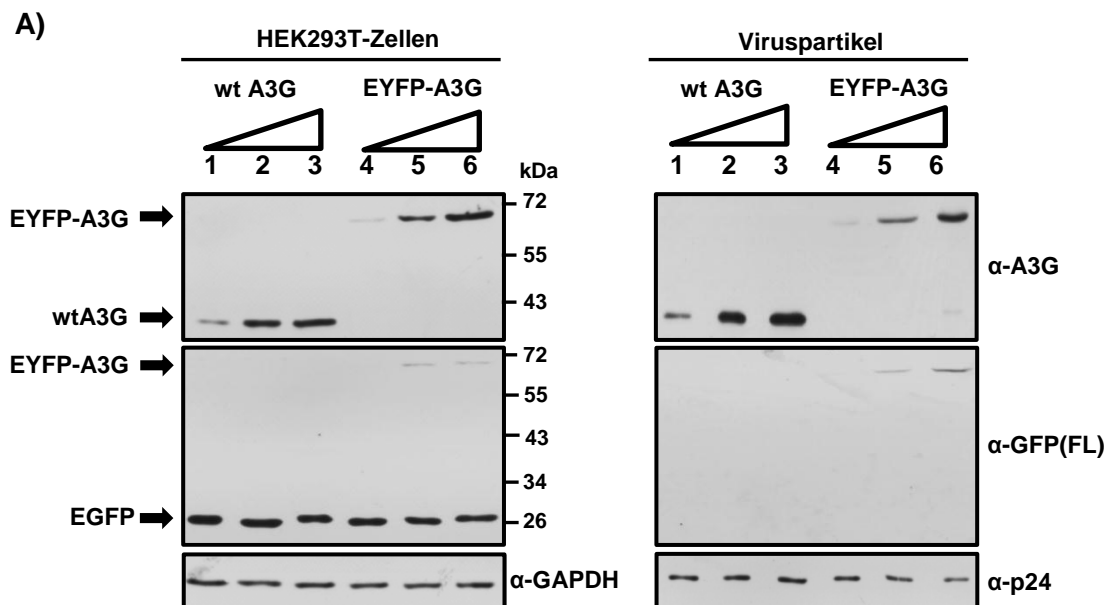


Abbildung 4.3: EYFP-A3G ist im Cytoplasma lokalisiert und wird bei Ko-Expression von Vif abgebaut. (A) HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden, die für EYFP-A3G und wildtypisches Vif bzw. für ein interaktionsdefizientes Vif (H43A/Y44A) kodieren, im Verhältnis 1:4 (A3G:Vif) transient ko-transfiziert und die Transgenexpression 48 h später mittels Western Blot und Fluorometer analysiert. GAPDH diente im Western Blot als Beladungskontrolle. (B) HEK293T-Zellen wurden mit dem EYFP-A3G Expressionskonstrukt transient transfiziert und nach 24 h mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Werte in (A) repräsentieren den Mittelwert \pm SD einer Dreifachbestimmung. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; RFI, Relative Fluoreszenzintensität; WB, Western Blot; N, Zellkern; Pfeile, hochfluoreszente Foci.

Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse (Abb. 4.3 B) von EYFP-A3G exprimierenden HEK293T-Zellen konnte weiterhin die für wtA3G typische zytoplasmatische Anreicherung zeigen (Wichroski et. al., 2006). Im Zellkern hingegen konnte nur ein äußerst schwaches EYFP-Signal detektiert werden. Zusätzlich traten cytoplasmatisch lokalisierte, hochfluoreszente Foci auf.

Es wurde weiterhin überprüft ob EYFP-A3G, wie bereits für wildtypisches A3G beschrieben, spezifisch in Viruspartikel inkorporiert wird und die Infektiosität von HIV basierten Reportergenviren hemmt. Dazu wurden HEK293T-Zellen transient mit steigenden Mengen an EYFP-A3G bzw. wtA3G Konstrukt und den für die Produktion von VSV-G pseudotypisierten von HIV abgeleiteten replikationsinkompetenten GFP-Reportergenviren notwendigen Expressionsplasmiden ko-transfiziert. Der erhaltenen virushaltige Zellkulturüberstand und die zur Partikelproduktion genutzten Zellen wurde aufgearbeitet und mittels Western Blot analysiert (Abb. 4.4 A). Die Infektiosität der Viruspartikel wurde zusätzlich in einem sogenannten „single round infectivity“-Assay bestimmt (Abb. 4.4 B).



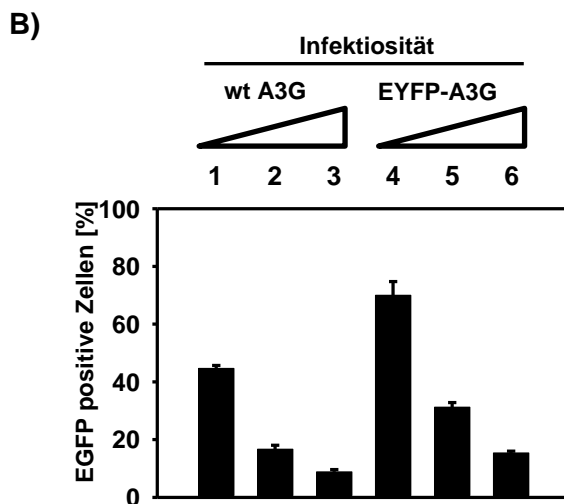


Abbildung 4.4: EYFP-A3G wird spezifisch in Viruspartikel verpackt und hemmt nachfolgend die Virusinfektion. (A) Die Herstellung von VSV-G pseudotypisiertem HIV-EGFP Reportervirus erfolgte mit HEK293T-Zellen nach der Zwei-Plasmid-Methode in Gegenwart steigender Mengen an wtA3G oder EYFP-A3G ohne Vif. Nach erfolgreicher Virusproduktion wurden die Virus-produzierenden HEK293T-Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert (HEK293T-Zellen). Der virushaltige Überstand wurde geerntet, ein Teil davon durch Ultrazentrifugation aufgereinigt und mittels Western Blot analysiert (Viruspartikel). GAPDH und p24 dienten als Beladungskontrolle. (B) HeLa-Zellen wurden mit Proben an 10-fach konzentriertem Virusüberstand bei gleicher Konzentration an Kapsidprotein (p24) transduziert und 48 h später die EGFP-Reporter Expression mittels FACS quantifiziert. Die Werte in (B) repräsentieren den Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Transduktionen. Abbildungen modifiziert nach Nowotny et al. 2010.

Anhand der Ergebnisse der Western Blot Analyse lässt sich feststellen, dass sowohl wtA3G als auch EYFP-A3G in die Viruspartikel eingebaut wird. Ein Vergleich der Konzentrationen des durch den viralen Reportervektor kodierte EGFP und A3G in den zur Virusproduktion eingesetzten Zellen und im Virus deuten auf eine spezifische Inkorporation beider A3G Proteine hin, da kein EGFP in den Viruspartikeln detektiert werden konnte. Gekennzeichnet durch ein niedrigeres WB-Signal, verlief der Einbau des EYFP-A3G Konstrukts allerdings weniger effektiv als der von wtA3G. Im Transduktionsversuch zeigte EYFP-A3G im Vergleich zu wtA3G eine etwas geringere antiretrovirale Aktivität. Ein Umstand, der sich am ehesten mit der niedrigeren Inkorporationsrate erklären lässt. Ein Teil der transduzierten HeLa-Zellen wurden dazu verwendet die Frage zu klären, ob die antivirale Wirkung mit auf einer G zu A Hypermutation des viralen Genoms beruht und ob wtA3G und EYFP-A3G vergleichbare Mutationsmuster im Virusgenom hinterlassen. Zur Klärung dieser Fragen wurde das integrierte virale EGFP-Reportergen mittels PCR aus den Zielzellen isoliert, die PCR-Amplifikate subkloniert und anschließend einzelne Klone sequenziert (Abb. 4.5).

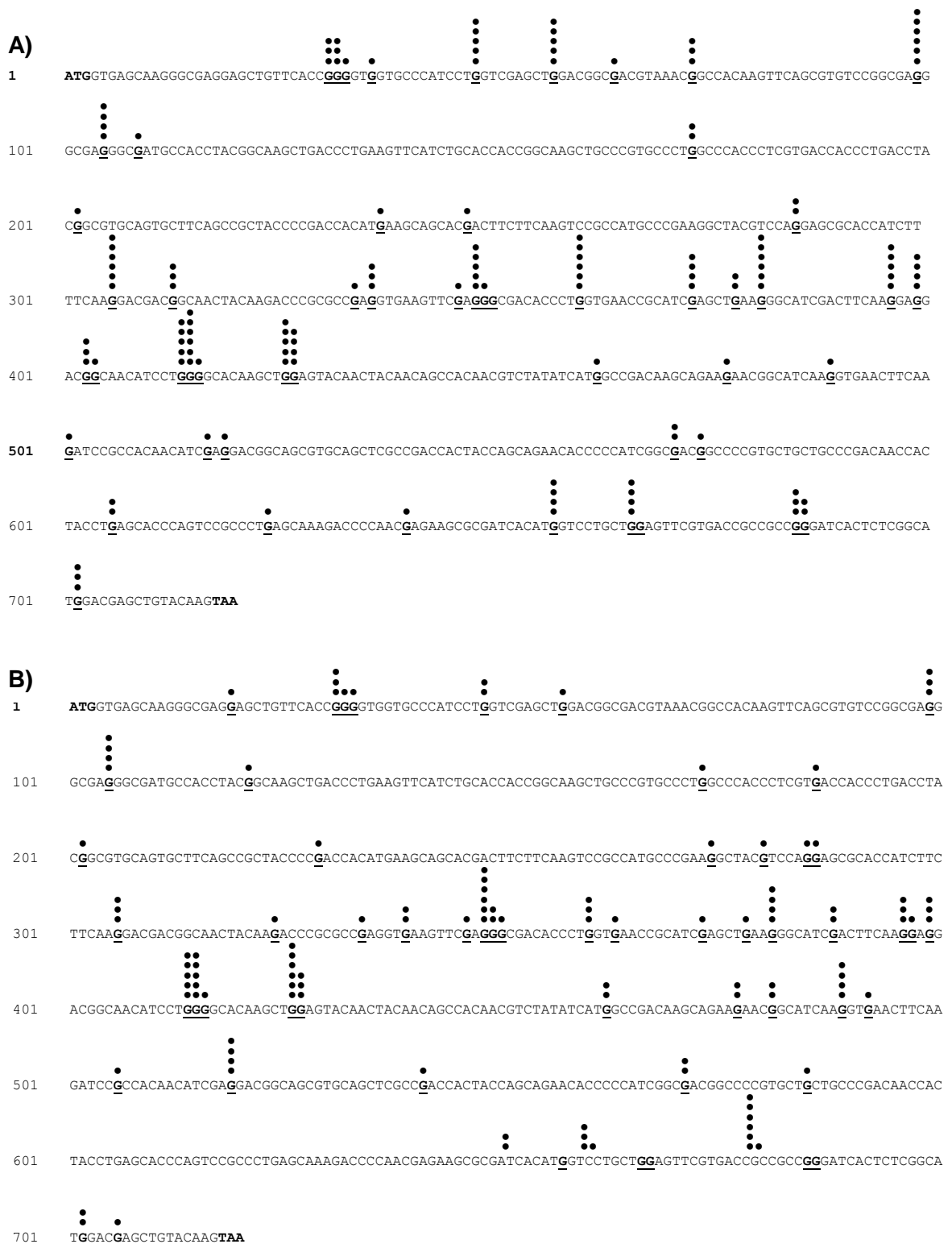


Abbildung 4.5: Die Restriktion von HIV-1 durch A3G ist Deaminase-abhängig. Die Generierung von VSV-G pseudotypisiertem HIV-1-EGFP Reportervirus erfolgte mit HEK293T-Zellen in Gegenwart von wtA3G (A) oder EYFP-A3G (B). Der virushaltige Überstand wurde dazu verwendet HeLa-Zellen zu transduzieren. Nachfolgend wurde das integrierte virale EGFP-Reportergen mittels PCR isoliert, subkloniert und die Sequenz von je 10 Einzelklonen analysiert. Punkte, G zu A Mutationen. Abbildungen nach Nowotny et al. 2010.

Die Resultate der Sequenzierungen zeigen eine deutliche A3G-typische Editierung der in das Wirtsgenom integrierten viralen DNA. Zudem besteht kein Unterschied zwischen den Mutationsmustern beider A3G-Proteine. Für wtA3G konnten insgesamt 52 Mutationsstellen und für EYFP-A3G insgesamt 55 Mutationsstellen gefunden werden. In beiden Fällen fand sich eine Häufung von Mutationen im Bereich der Basenposition 301 bis 450 in der EGFP-Sequenz. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Markierung von A3G mit dem gelbfluoreszierenden Protein EYFP keinen nennenswerten Einfluss auf seine wildtypische Funktion hat.

4.1.2.2. Charakterisierung des TetOff-Vif-Expressionssystems

In einem nächsten Schritt erfolgte die Prüfung des TetOff-Vif-Expressionssystems. Dabei stand die Frage nach der Induzierbarkeit der Vif-Expression im Vordergrund. Da die Vif Expressionskassette in einem von HIV-1 abgeleiteten Vektor eingebettet ist, konnten VSV-G pseudotypisierte Viruspartikel hergestellt werden. Diese wurden dazu genutzt HEK293T-Zellen zu transduzieren. Auf diesem Weg erfolgte die Herstellung einer HEK293T-Zelllinie, in deren Genom die TetOff-Vif-Expressionskassette stabil integriert ist. Zur Überprüfung der Induzierbarkeit der Vif-Expression wurden die Zellen über einen festgelegten Zeitraum mit Doxycyclin behandelt und die Vif-Expression mittels Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 4.6 zu erkennen ist, kann die Vif-Expression über die Zugabe von Doxycyclin gesteuert werden. Neben dem Nachweis der Vif-Expression wurde nach elektrophoretischer Probenauftrennung und Western Blot Transfer mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper gefärbt. Für Vif ist bekannt, dass es einem schnellem intrazellulärem Abbau unterliegt und dieser essentiell für seine biologische Funktion ist (Khamsri et al., 2006; Nathans et al., 2008). Die hohe Umsatzrate von Vif wird dabei durch die Polyubiquitinierung von Vif, mit sich anschließender Proteasom vermittelter Degradation kontrolliert (Fujita et al., 2004). Im vorliegenden Versuch führte die Induktion der Vif-Expression zu einer Erhöhung des Ubiquitinsignals bei > 200 kDa. Es konnten jedoch keine ubiquitinierten Vif-Spezies detektiert werden.

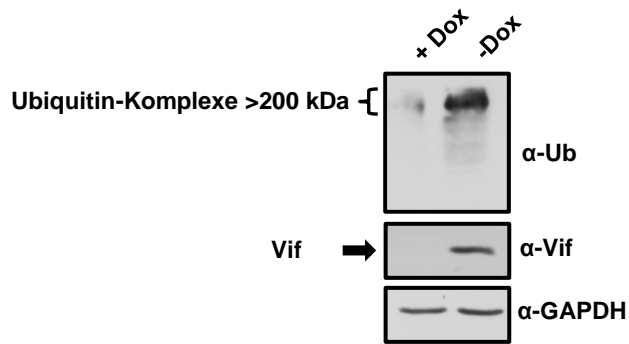


Abbildung 4.6: Die Vif-Expression ist Doxycyclin kontrolliert. HEK293T-Zellen wurden mit VSV-G pseudotypisiertem pTTT-Vif Virus transduziert und für 48 h in Abwesenheit (-Dox) oder Anwesenheit (+Dox) von 10 ng/mL Doxycyclin kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

4.1.3. Generierung und Charakterisierung der 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}-Zelllinie

Zur Herstellung der 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}-Zelllinie wurden zunächst HEK293T-Zellen mit dem pTTT-Vif Vektor transduziert und anschließend mit dem EYFP-A3G Konstrukt stabil transfiziert. Um die Integrationsrate der EYFP-A3G Expressionskassette zu erhöhen, wurde das Expressionsplasmid zuvor mit dem Restriktionsenzym Eam1105I linearisiert. Da das EYFP-A3G Expressionsplasmid zusätzlich für eine Puromycinresistenz kodiert, konnten EYFP-A3G positive Klone unter Verwendung von Puromycin selektiert werden. Im nachfolgenden Schritt wurde diejenige Zellfraktion mittels FACS-Technik isoliert, die auf eine Doxycyclin-Behandlung mit einer Veränderung des EYFP-A3G Expressionsniveaus reagierte. Die sich anschließende Gewinnung eines monoklonalen Zellklons erfolgte mittels des Grenzverdünnungsverfahrens (Staszewski, 1984). Es konnten insgesamt 32 Zellklone isoliert werden, wobei ein Klon mit einer 15-fachen Erhöhung der EYFP-Fluoreszenz auf die Behandlung mit Doxycyclin ansprach. Abbildung 4.7 zeigt die Isolierung des 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}-Zellklons anhand der FACS-Daten. Der 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}-Zellklon wurde für alle nachfolgenden Versuche verwendet.

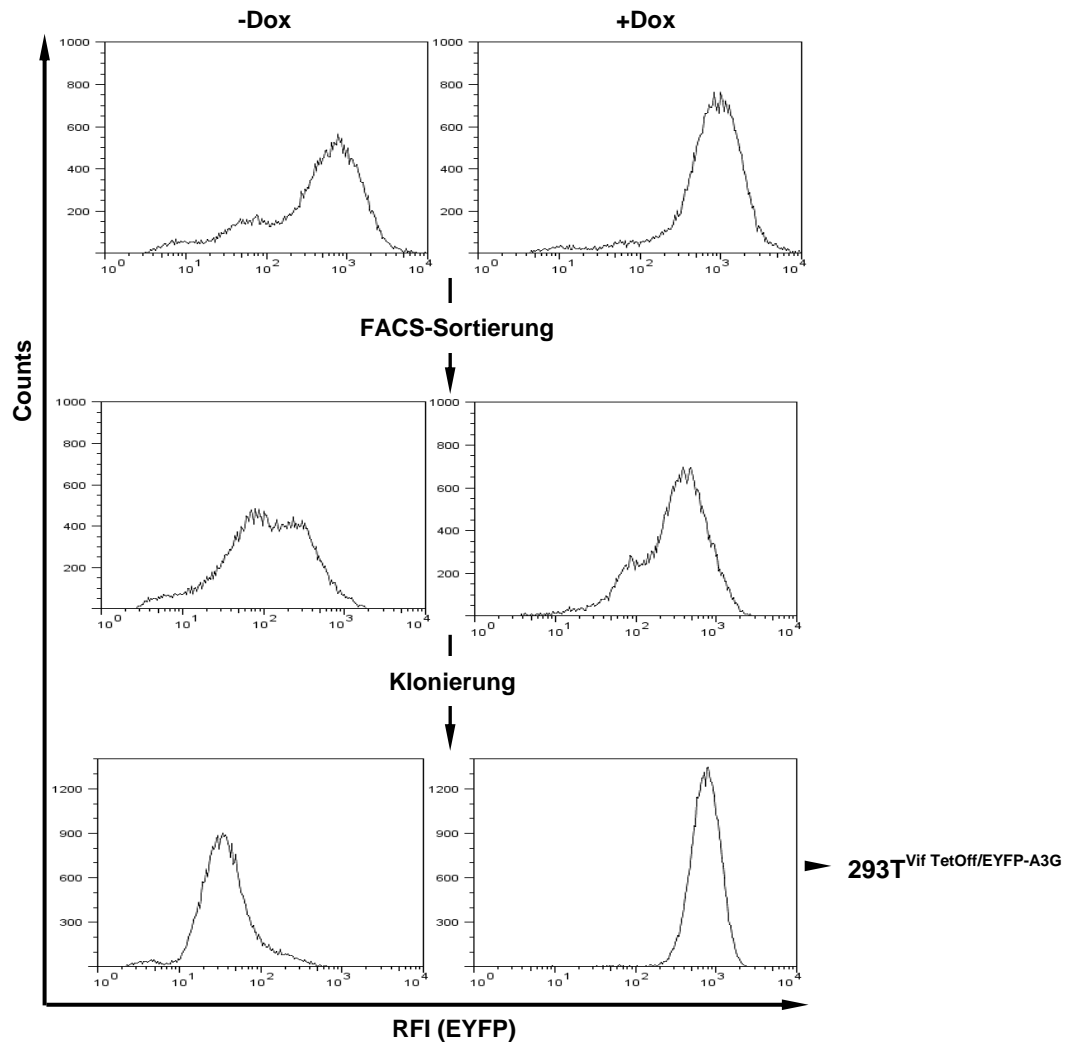


Abbildung 4.7: Isolierung des monoklonalen HEK293T-Zellklons der EYFP-A3G und TetOff reguliertes Vif stabil ko-exprimiert. RFI, Relative Fluoreszenzintensität; Dox, Doxycyclin.

Die Induzierbarkeit der Vif-Expression durch Doxycyclin und dem damit verbundenen Abbau des A3G-Fusionskonstruktes konnte neben der Fluoreszenzmessung auch anhand einer Western-Blot Analysen nachgewiesen werden (Abb. 4.8). In Abwesenheit von Doxycyclin, d.h. bei induzierter Vif-Expression, erfolgte ein nahezu vollständiger Abbau von EYFP-A3G. Lediglich mit dem verwendeten A3G-spezifischen Antikörper konnten noch sehr geringe Mengen an EYFP-A3G nachgewiesen werden.

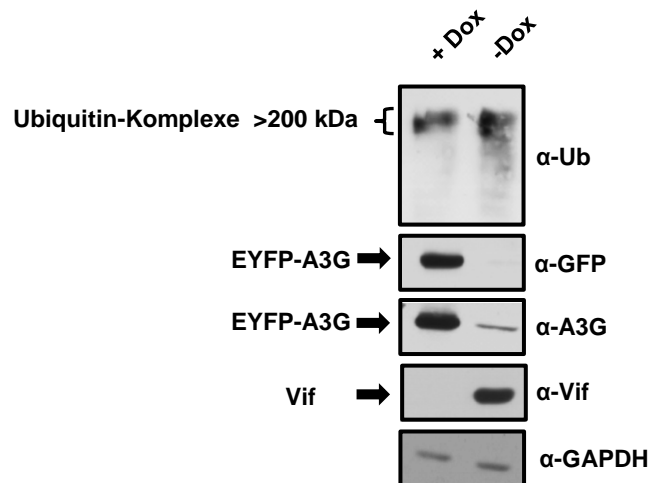


Abbildung 4.8: Der Abbau von EYFP-A3G ist Vif abhängig. $293T^{VifTetOff/EYFP-A3G}$ -Zellen wurden für 72 h in Abwesenheit (-Dox) oder Anwesenheit (+Dox) von 10 ng/mL Doxycyclin kultiviert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Lysate mittels Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Abbildung modifiziert nach Nowotny et al. 2010.

Der Abbau von A3G wird durch das Ubiquitin-abhängige Proteasomsystem vermittelt. Dazu bedarf es der kovalenten Anheftung von Ubiquitinmolekülen an APOBEC3G. Zum Nachweis der Polyubiquitinierung des A3G-Fusionsproteins wurden die Zelllysate zusätzlich mit einem gegen Ubiquitin gerichteten Antikörper analysiert. Wie in Abbildung 4.8 zu sehen ist, war in Abwesenheit von Doxycyclin die Gesamtmenge an zellulären Ubiquitinierungsprodukten, angezeigt durch ein stärkeres Ubiquitinsignal, erhöht. Wie auch schon bei der Untersuchung zur Induzierbarkeit des TetOff-Vif-Expressionskonstrukts (pTTT-Vif), konnten im vorliegenden Fall keine ubiquitinierten Formen von A3G noch von Vif nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob das in den $293T^{VifTetOff/EYFP-A3G}$ -Zellen exprimierte EYFP-A3G antiviral aktiv ist, wurden VSV-G pseudotypisierte EGFP-Reporterviren unter Verwendung der $293T^{VifTetOff/EYFP-A3G}$ -Zellen in Abwesenheit und Anwesenheit von Doxycyclin generiert. Ein Teil der Virusernte wurde für die Western-Blot Analyse mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgearbeitet, während der verbliebene Rest zur Transduktion von HeLa-Zellen verwendet wurde. Die Analyseergebnisse sind nachfolgend in Abbildung 4.9 dargestellt.

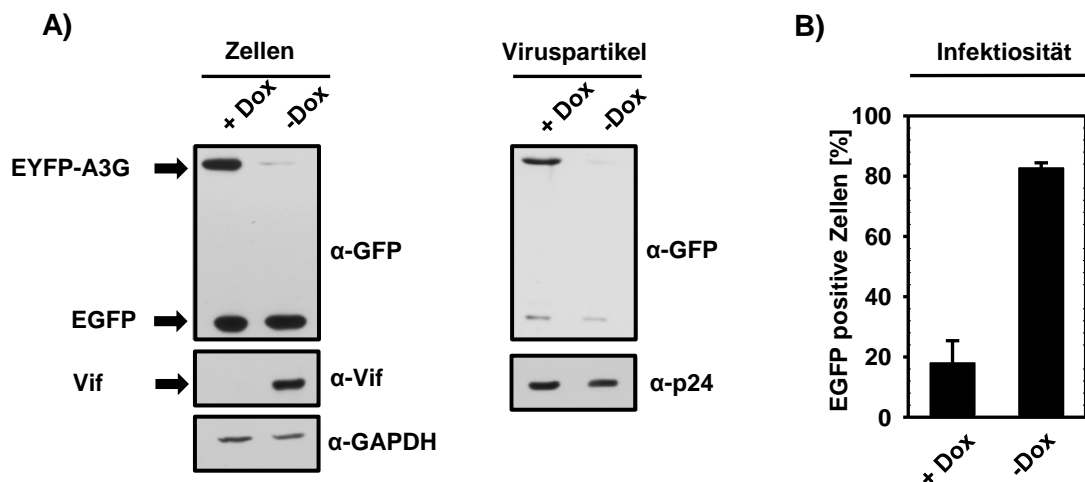


Abbildung 4.9: Die $293T^{Vif\ TetOff/EYFP-A3G}$ -Zelllinie exprimiert voll funktionsfähiges EYFP-A3G. Es wurde HIV-EGFP-Reportervirus nach der Zwei-Plasmid-Methode in Abwesenheit (-Dox) und Anwesenheit (+Dox) von 10 ng/mL Doxycyclin in $293T^{Vif\ TetOff/EYFP-A3G}$ -Zellen hergestellt. Im Anschluss an die Virusproduktion wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert (A, Zellen). Der virushaltige Überstand wurde geerntet, ein Teil durch Ultrazentrifugation aufgereinigt und ebenfalls mittels Western Blot analysiert (A, Viruspartikel). (B) HeLa-Zellen wurden mit Proben an 10-fach konzentriertem Virusüberstand mit gleichem p24-Gehalt transduziert und 48 h später die EGFP-Reporter Expression mittels FACS quantifiziert. Die Werte in (B) repräsentieren den Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Transduktionen. GAPDH und p24 diente im Western Blot als Beladungskontrolle. Abbildung modifiziert nach Nowotny et al. 2010.

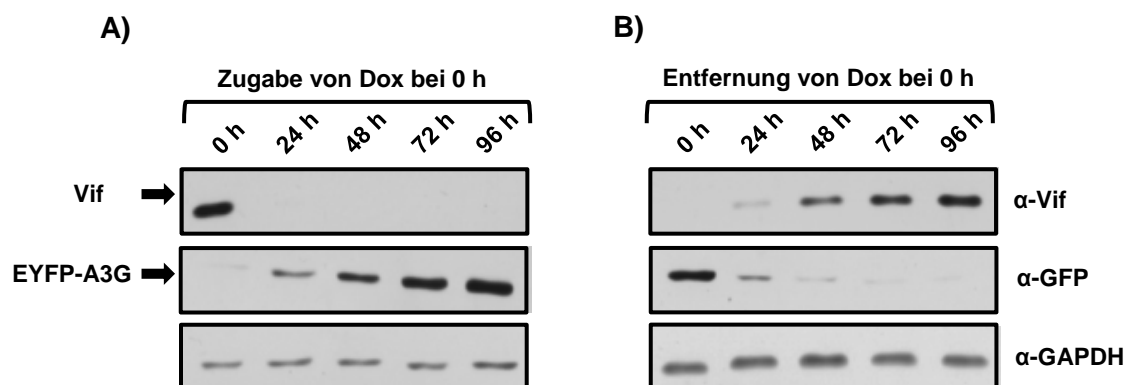
Wie die Ergebnisse der Western Blot Analyse in Abb. 4.9 A belegen, hatte die Produktion des EGFP-Reportervirus weder einen Einfluss auf die Induzierbarkeit der Vif-Expression noch auf die Degradation von EYFP-A3G. Ferner konnte gezeigt werden, dass EYFP-A3G in die Viruspartikel inkorporiert wird und, unter Einbeziehung der EGFP-Signalstärke in den zur Virusproduktion eingesetzte Zellen und den Partikel, dieser Einbau spezifischer Natur war. Im Gegensatz zu den in Abbildung 4.4 A dargestellten Ergebnissen, konnten im vorliegenden Fall jedoch auch geringe Mengen des durch den viralen Reportervektor kodierte EGFP in den Viruspartikeln nachgewiesen werden. Das schwache EGFP-Signal ist höchstwahrscheinlich auf eine Kontamination zurückzuführen, die während der Partikelreinigung aufgetreten ist.

Im Rahmen des Transduktionsversuches (Abb. 4.9 B) konnte gezeigt werden, dass die Inkorporation von EYFP-A3G eine deutliche Hemmung der Partikelinfektiosität zur Folge hatte. Nur 20% der HeLa-Zielzellen waren EGFP positiv, wohingegen die Ko-Expression von Vif während der Partikelproduktion in nahezu vollinfektiösem Reportervirus resultierte, wie durch einen Titer von 80% EGFP positiven Zielzellen angezeigt ist. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das durch die $293T^{Vif\ TetOff/EYFP-A3G}$ -Zellen exprimierte EYFP-A3G

Fusionsprotein spezifisch in Viruspartikel verpackt wird und die Infektiosität des Reportervirus vermindert. Die Experimente ergaben weiterhin, dass die Induktion der Vif-Expression in einer Depletion von EYFP-A3G resultiert und damit verbunden die Infektiosität des Reportervirus erhalten bleibt.

4.1.3.1. Analysen zur Kinetik des EYFP-A3G Abbaus

Zur näheren Charakterisierung der Kinetik des Vif induzierten EYFP-A3G Abbaus wurden $293T^{Vif\ TetOff/EYFP-A3G}$ Zellen in Abwesenheit und Anwesenheit von Doxycyclin kultiviert und das Expressionsniveau von sowohl EYFP-A3G als auch Vif zu definierten Zeitpunkten mittels Western Blot und Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 4.10). Wie die Analysen ergaben, korrelierte die Doxyzyklin-abhängige Induktion der Vif-Expression mit der Abnahme der zellulären EYFP-A3G Konzentration. Wie Abbildung 4.10 A und C zeigen, resultierte aus der Suppression der Vif-Expression (Zugabe von Doxycyclin) eine rapide Anreicherung von EYFP-A3G in den Zellen, wobei die maximale Konzentration nach 48-72 h Doxycyclin-Behandlung erreicht wurde. Längere Behandlungszeiten führten zu keiner weiteren Erhöhung der EYFP-A3G Konzentration. Die Analyse der Vif-Expression bestätigt die bereits für Vif beschriebene geringe zelluläre Halbwertszeit bzw. hohe Umsatzrate (Khamsri et al., 2006; Nathans et al., 2008). Bereits 24 h nach Zugabe von Doxycyclin (Repression der Vif-Expression) konnte kein Vif mehr detektiert werden (Abbildung 4.10 A).



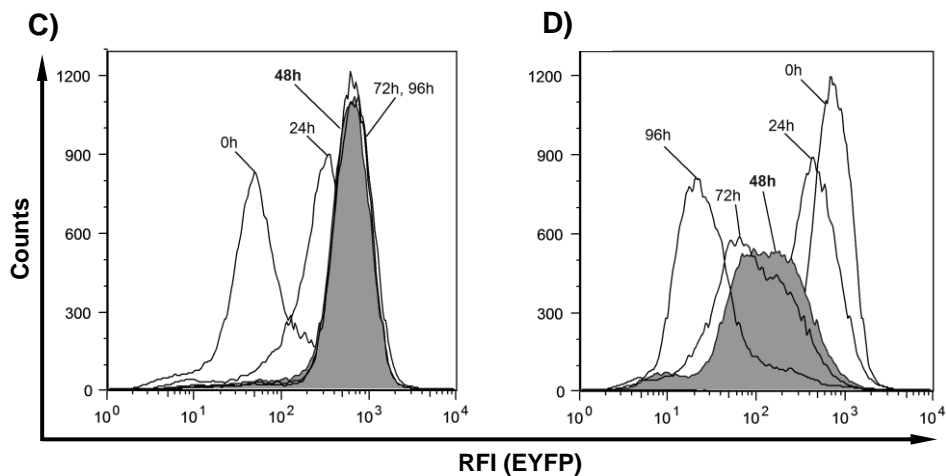


Abbildung 4.10: Die Vif induzierte Degradation von EYFP-A3G offenbart eine schnelle Kinetik. Vor der Aussaat wurden die $293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}$ -Zellen für 120 h in Abwesenheit (A und C) oder Anwesenheit (B und D) von 10 ng/mL Doxycyclin kultiviert. Nach Zellaussaat erfolgte die Anzucht in Doxycyclin-freiem (B und D) oder Doxycyclin-haltigem Medium (A und C, 10 ng/mL). Es folgte eine FACS-Analyse sowie eine Untersuchung mittels Western Blot nach den angegebenen Zeiten. Es wurden mindestens je 20000 Zellen für die FACS Analyse eingesetzt. GAPDH diente im Western Blot als Beladungskontrolle. RFI, relative Fluoreszenzintensität. Abbildung modifiziert nach Nowotny et al. 2010.

Unmittelbar auf die Entfernung von Doxycyclin (Induktion der Vif-Expression), durch das Austauschen des Kulturmediums gegen Doxycyclin-freies Medium, folgte der rasche Abbau von EYFP-A3G bei gleichzeitiger Zunahme der zellulären Vif-Konzentration. Innerhalb der ersten 48 h nach Induktion der Vif-Expression wurde der EYFP-A3G Level um den Faktor 5 reduziert und nach 96 h die Basislinie erreicht. Der 96 h-Wert in Abbildungen 4.10 D korrespondieren mit dem 0 h-Wert in Abbildung 4.10 B.

Zur Titration der Konzentration an Doxycyclin, die ausreichend für die Kontrolle des Vif induzierten EYFP-A3G Abbaus ist, wurden $293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}$ -Zellen in Gegenwart von steigenden Mengen (0,001 ng/mL bis 10 ng/mL) Doxycyclin kultiviert und die EYFP-Fluoreszenz mittels FACS quantifiziert (Abb. 4.11).

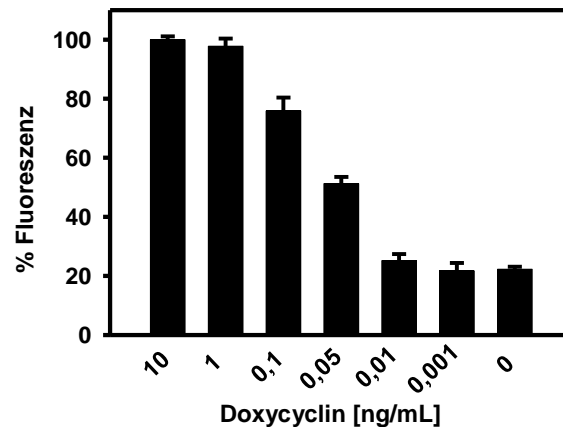


Abbildung 4.11: Bestimmung der Doxycyclin Konzentration, die ausreichend für die Kontrolle der EYFP-A3G Degradation ist. Vor der Aussaat wurden die 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}-Zellen für 96 h in Abwesenheit von Doxycyclin kultiviert. Die Bestimmung der minimalen Doxycyclin Konzentration erfolgte durch Austausch des Aussaatmediums gegen Kulturmedium mit steigenden Mengen an Doxycyclin. Nach 48 h wurde die EYFP-A3G Fluoreszenz mittels FACS quantifiziert. Der 100%-Wert entspricht der Fluoreszenzintensität, die bei einer Konzentration von 10 ng/mL Doxycyclin gemessen wurde. Es wurden mindestens 20000 Zellen für die FACS Analyse eingesetzt. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Doppelbestimmungen.

Die Daten in Abbildung 4.11 zeigen, dass es bereits bei einer Konzentration von 0,05 ng/mL Doxycyclin, wie durch eine Erhöhung des EYFP-Signals angezeigt, zu einer Suppression der Vif-Expression kam, wohingegen niedrigeren Konzentrationen keinen Effekt zeigten. Bei einer Konzentration von 0,1 ng/mL war das EYFP-A3G Signal um 25% gegenüber der 100% Kontrolle reduziert. Eine Doxycyclin Konzentration von ≥ 1 ng/mL führt zu einer vollständigen Suppression der Vif-Expression und damit verbunden zum Stopp des Abbaus von EYFP-A3G.

4.1.3.2. Untersuchungen zum Proteasom-vermittelten EYFP-A3G Abbau unter Verwendung spezifischer Inhibitoren des Proteasomsystems

Um sicherzustellen, dass die beobachtete Degradation von EYFP-A3G durch das Ubiquitin-abhängige Proteasomsystem vermittelt wird, wurden die Zellen bei induzierter Vif-Expression mit MG132 und PYR41 behandelt (Abb. 4.12). Bei MG132 handelt es sich um ein Tripeptid-

Aldehyd Protease Inhibitor, der primär die Chymotrypsin-Aktivität des Proteasoms inhibiert und routinemäßig experimentell für die direkte Blockierung des Proteasoms genutzt wird (Lee et al., 1998). PYR41 hingegen inhibiert die Funktion der E1-Ligase (Yang et al., 2007), der, wie in der Einleitung bereits erwähnt, eine entscheidende Rolle bei der Ubiquitinierung von A3G und damit bei seinem proteasomalen Abbau zukommt.

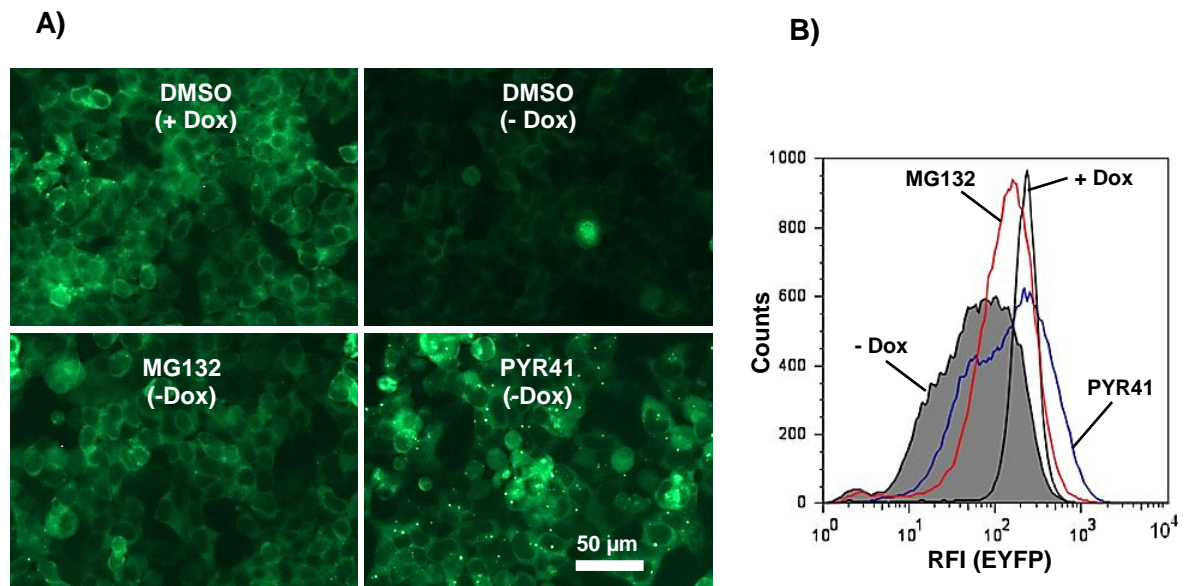


Abbildung 4.12: Der Vif induzierte Abbau von A3G wird durch die Inhibitoren MG132 und PYR41 gehemmt. Vor der Aussaat wurden die 293T^{Vif TetOff /EYFP-A3G}-Zellen für 96 h in Gegenwart von 10 ng/mL Doxycyclin kultiviert, dann auf 6-Well Kulturplatten übertragen und für weitere 48 h in Anwesenheit von 1 ng/mL Doxycyclin inkubiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung für 24 h mit 0,2 μM MG132, 50 μM PYR41 und 0,5% DMSO (Positivkontrolle) in Abwesenheit von Doxycyclin oder in Anwesenheit von 1 ng/mL Doxycyclin und 0,5% DMSO (Negativkontrolle). Die Zellen wurden nachfolgend fluoreszenzmikroskopisch (A) oder mittels FACS (B) analysiert. Es wurden mindestens 50000 Zellen für die FACS-Analyse eingesetzt.

Wie in Abbildung 4.12 A gezeigt, führte die Behandlung der Zellen mit MG132 und PYR-41 zu einer signifikanten Erhöhung des zellulären EYFP-A3G Signals. Auch die FACS-Analyse (Abbildung 4.12 B) ergab, dass 0,2 μM MG132 ausreichend waren, um den Abbau von EYFP-A3G effizient zu inhibieren. Wie auch im Fall von MG132 resultierte aus der Behandlung mit PYR41 eine effiziente Blockierung der EYFP-A3G Degradation. Überraschenderweise führte, verglichen mit den anderen Proben, PYR41 zu einem vermehrten Auftreten von hochfluoreszenten cytoplasmatischen Aggregaten (Abbildung 4.12 A).

4.1.3.3. Evaluierung der 293T^{VifTetOff/EYFP-A3G}-Zelllinie für die Substanzsuche im 96-Well Format

Die Evaluierung eines Testsystems für die Substanzsuche im Hochdurchsatzverfahren wird routinemäßig anhand des Z-Faktor vorgenommen (Zhang et al., 1999).

Zur Feststellung der Brauchbarkeit des A3G-Abbauassays für das Substanzscreening wurde dessen Z-faktor bestimmt (Abb. 4.13). Dazu wurden 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}-Zellen auf eine 96-Well Kulturplatte ausgesät und in Abwesenheit oder Anwesenheit von Doxycyclin kultiviert. Anhand der gemessenen EYFP-Fluoreszenzwerte konnte ein Z-Faktor von 0,67 errechnet werden. Als Richtwert für die Einsetzbarkeit eines Assays für das Substanzscreening im Hochdurchsatzverfahren gilt ein Z-Faktor von mindestens 0,5.

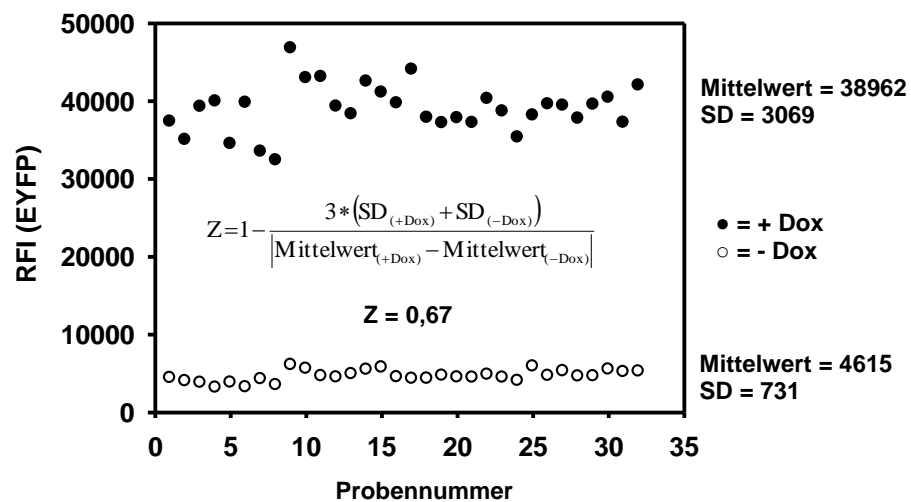


Abbildung 4.13: Bestimmung des Z-Faktors für den A3G-Abbauassays. Es wurden 15000 293T^{VifTetOff/EYFP-A3G}-Zellen pro Vertiefung auf eine 96-Well Kulturplatte ausgesät und für 96 h in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ng/mL Doxycyclin kultiviert. Nachfolgend erfolgte die Quantifizierung der EYFP-A3G-Fluoreszenz mittels Fluorometer mit sich anschließender Berechnung des Z-Faktors, anhand der in der Grafik dargestellten Formel. SD, Standardabweichung; RFI, Relative Fluoreszenzintensität; Dox, Doxycyclin.

4.2. Entwicklung von Testsystemen zum Ausschluss falsch positiv wirkender Substanzen

Zur Identifizierung falsch positiv wirkender Substanzen wurden zwei Zelllinie-basierte Kontrollsysteme etabliert. Eines dieser Testsysteme basiert auf HeLa-Zellen, welche das rot fluoreszierende Protein DsREDmonomer (Campbell et al., 2002) unter der Kontrolle des TetOff-Expressionssystem stabil exprimieren (HeLa^{DsREDmonomerTetOff}-Zelllinie). Dieses System

ermöglicht die Detektion von Verbindungen, die Einfluss auf die Funktion des TetOff-Expressionssystem nehmen oder mit der allgemeinen zellulären Proteinexpression interferieren. Der zweite Kontrollassay dient zur Identifizierung von Substanzen, die in den proteasomalen Proteinabbau eingreifen. Basis dieses Assays ist eine HEK293T-Zelllinie, die konstitutiv ein aus der vom Transkriptionsfaktor HIF-1 α abgeleiteten *oxygen dependent degradation domain* (ODD) und dem blau fluoreszierenden Protein SBFP2 (Kremers et al., 2007) bestehendes Fusionsprotein stabil überexprimiert (293T^{ODD-SBFP2}-Zelllinie). Die ODD-Domäne vermittelt dabei den rapiden und kontinuierlichen Ubiquitin-unabhängigen proteasomalen Abbau von SBFP2. Eine Blockierung des proteasomalen Proteinabbaus führt zu einer Akkumulierung von ODD-SBFP2. Das Expressionsniveau des ODD-SBFP2 Fusionsproteins gibt damit Auskunft über die Aktivität des Proteasomsystems.

4.2.1. Generierung und Charakterisierung der HeLa^{DsREDmonomerTetOff}-Zelllinie

Zur Herstellung der HeLa^{DsREDmonomerTetOff}-Zelllinie wurden HeLa-Zellen mit dem viralen DsRED-monomer TetOff Expressionsvektor pTTT-DsREDmonomer (Abb. 4.14) transduziert. Bis auf das Reportergen ist der Aufbau des DsREDmonomer-TetOff Expressionskonstrukts identisch mit dem des TetOff-Vif-Expressionskonstrukts (pTTT-Vif, Abb. 4.2 B). Auf die Transduktion folgte die Isolierung von DsREDmonomer positive Zellen mittels FACS-Technik. Zur Gewinnung von Zellen mit einer ausreichend hohen DsREDmonomer-Expressionsrate, bedurfte es insgesamt drei Sortierungerunden. Anders als bei der Etablierung des A3G-Abbauassays erfolgte hier keine weitere Isolierung eines monoklonalen Zellklons durch Subklonierung. Alle folgenden Versuche wurden mit einer polyklonalen Kultur aus DsREDmonomer positiven Zellen durchgeführt.

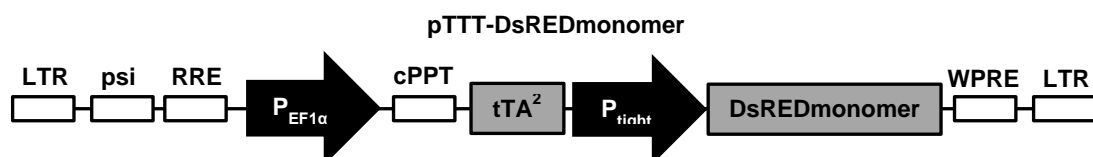


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung des viralen pTTT-DsREDmonomer Konstrukts, das zur Herstellung der HeLa^{DsREDmonomerTetOff}-Zelllinie verwendet wurde. Zur Erklärung der aufgeführten Abkürzungen siehe Abb. 4.2.

Zum Test auf Eignung als Assay für das Substanzscreening im Multiwellformat wurden HeLa^{DsREDmonomerTetOff}-Zellen auf einer 96-Well Platte ausgesät, für 48 h in Abwesenheit und Anwesenheit von Doxycyclin kultiviert und anschließend die DsREDmonomer Expression mittels Fluorometer und Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 4.15 A und B).

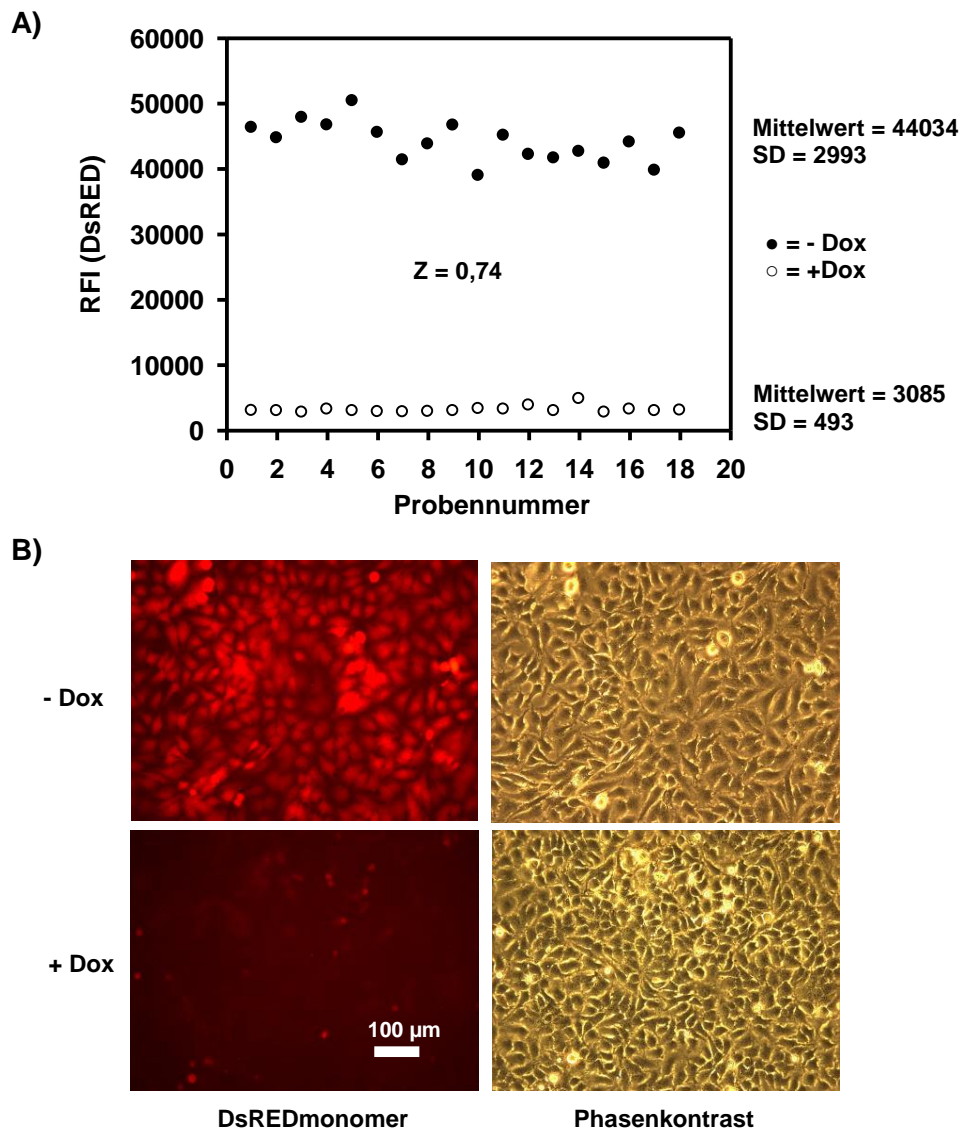


Abbildung 4.15: Evaluierung der HeLa^{DsREDmonomerTetOff}-Zelllinie. (A) Zur Bestimmung des Z-Faktors wurden Zellen auf eine 96-Well Platte in einer Konzentration von 15000 Zellen pro Vertiefung ausgesät und für 48 h in Abwesenheit oder Anwesenheit von 0,1 ng/mL Doxycyclin kultiviert. Nachfolgend wurde die DsREDmonomer-Fluoreszenz mittels eines Fluorometers quantifiziert und der Z-Faktor bestimmt. (B) Vor der fluorometrischen Messung wurden die Zellen einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen SD, Standardabweichung; RFI, Relative Fluoreszenzintensität.

Die Ergebnisse der fluorometrischen Analyse als auch der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigen eine Doxycyclin-abhängige Induzierbarkeit der DsREDmonomer Expression (Abb. 4.15 A und B). In Gegenwart von Doxycyclin war das DsREDmonomer-Signal um mehr als eine Log-Stufe vermindert (Abb. 4.15 A). Anhand der mit dem Fluorometer ermittelten Fluoreszenzdaten konnte für dieses Testsystem ein Z-Faktor von 0,74 errechnet werden, was diesen Assay für die Durchmusterung von Substanzen im Hochdurchsatzverfahren auszeichnet.

4.2.2. Etablierung der 293T^{ODD-SBFP2}-Zelllinie als Proteasomkontrollassay

Die Generierung der 293T^{ODD-SBFP2}-Zelllinie erfolgte durch Transduktion von HEK293T-Zellen mit dem viralen Vektor pWPXL-ODD(aa401-603)-SBFP2 (Abb. 4.16). Dieser kodiert das aus der ODD-Domäne (Aminosäureposition in HIF-1 α , 401-603) und SBFP2 bestehende Proteasomreporterkonstrukt ODD-SBFP2. Unter Verwendung der FACS-Technik konnte eine Zellfraktion isoliert werden, die auf eine Inhibition des Proteasoms mit einem deutlichen Anstieg der Reporterengenfluoreszenz reagierte. Die isolierte Zellfraktion wurde expandiert und für alle nachfolgenden Versuche verwendet. Die Klonierung des viralen ODD-SBFP2 Expressionsvektors als auch die Herstellung der 293T^{ODD-SBFP2} Zelllinie wurden von Mirjam Otto im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt und sind dort detailliert beschrieben (Otto, 2010).

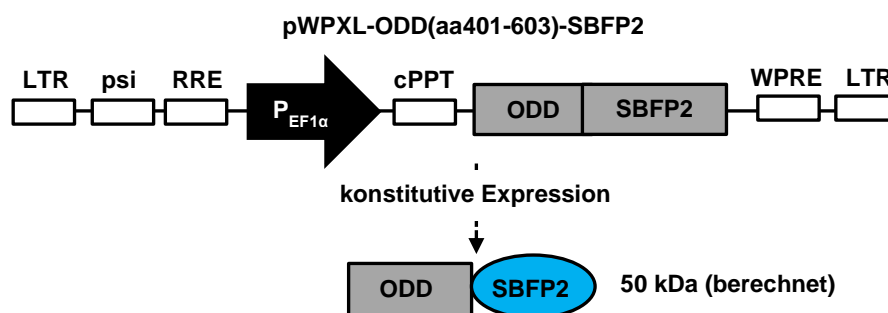


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung des viralen Expressionsvektors pWPXL-ODD(aa401-603)-SBFP2, der zur Herstellung der 293T^{ODD-SBFP2}-Zelllinie verwendet wurde. aa, amino acid, ODD, oxygen dependent degradation domain. Bezüglich der weiteren Abkürzungen siehe Abb. 4.2.

In der vorliegenden Arbeit wurde die 293T^{ODD-SBFP2}-Zelllinie weitergehend charakterisiert und als Testsystem für das Screening von niedermolekularen Verbindungen etabliert. Zur

Charakterisierung wurde die Wirkung von steigenden Mengen des E1-Ligase Inhibitors PYR41 und des Proteasominhibitors MG132 auf die ODD-SBFP2 Expression mittels Fluorometer (Abb. 4.17 A) und Western Blot analysiert (Abb. 4.17 B). Wie sich zeigte, inhibierte bereits eine Konzentration 0,05 μM MG132 den Abbau von ODD-SBFP2. Eine Konzentration von 0,2 μM führte zu einem 3,5-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität in der fluorometrischen Analyse (siehe Abb. 4.17 A). Im Fall von PYR41 erhöhte sich das ODD-SBFP2 Signal bei einer Konzentration von 50 μM lediglich um den Faktor 2. Bei 10 μM konnte nahezu kein Unterschied zur DMSO Kontrolle festgestellt werden. Die positive Wirkung von PYR41 in Form einer Erhöhung des ODD-SBFP2 Levels bestätigt den Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau des Fusionskonstrukts.

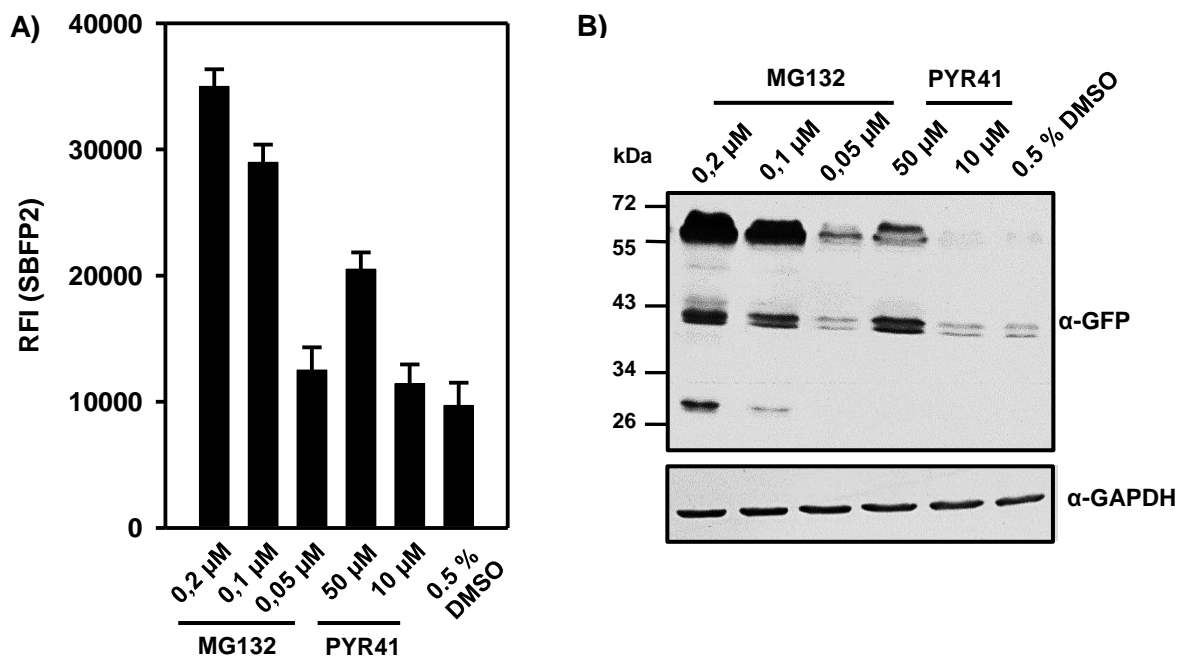


Abbildung 4.17: Die Inhibitoren MG132 und PYR41 hemmen den Abbau des ODD-SBFP2 Fusionskonstrukts. Zur Charakterisierung der Zelllinie wurde 24 h nach Zellaussaat das Aussaatmedium gegen Medium mit MG132, PYR41 oder DMSO ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Anschließend wurde die ODD-SBFP2 Expression mittels Fluorometer (A) oder Western Blot (B) analysiert. Die Werte in (A) repräsentieren den Mittelwert \pm SD einer Vierfachbestimmung. RFI, Relative Fluoreszenzintensität. GAPDH diente im Western Blot als Beladungskontrolle.

Die dosisabhängige inhibitorische Wirkung von MG132 und PYR41 auf die ODD-SBFP2 Degradation konnte ebenfalls im Western Blot gezeigt werden (Abb. 4.17 B). Unerwarteterweise konnten im Western Blot mit dem verwendeten GFP-spezifischen Antikörper drei deutliche Signale detektiert werden. Ein starkes Signal bei ca. 55 kDa, das mit großer

Wahrscheinlichkeit dem ODD-SBFP2 Fusionsprotein zuzuordnen ist und zwei schwächere Signale im Bereich von 40 kDa und 30 kDa. Der Grund für das Auftreten dieser Nebenbanden ist unklar. In einer Studie von Maranchie et al. traten bei der Expression eines aus der ODD-Domäne und GFP bestehenden Fusionskonstrukts neben dem Signal für das Fusionskonstrukt ebenfalls weitere Signale bei niedrigerem Molekulargewicht auf (Maranchie et al., 2002).

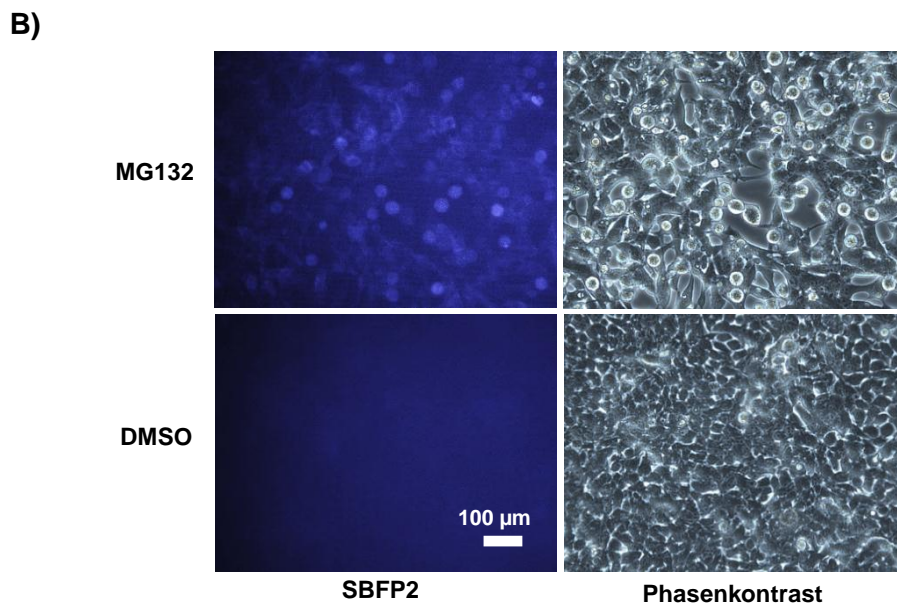
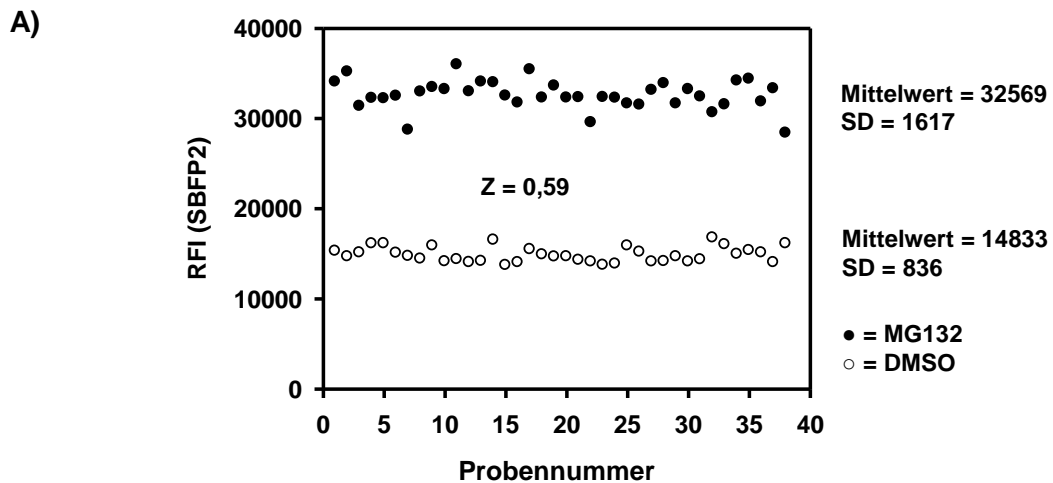


Abbildung 4.18: Evaluierung der 293T^{ODD-SBFP2}-Zelllinie. (A) Zur Bestimmung des Z-Faktors wurden Zellen auf eine 96-Well Platte in einer Konzentration von 15000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen für weitere 24 h in Gegenwart von 0,2 µM MG132 oder 0,5% DMSO kultiviert. Nachfolgend wurde die SBFP2-Fluoreszenz mittels Fluorometer quantifiziert und anhand der Daten der Z-Faktor bestimmt. (B) Vor der fluorometrischen Messung wurden die Zellen einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen. SD, Standardabweichung; RFI, Relative Fluoreszenzintensität.

Zur Bestimmung des Z-Faktors wurden Zellen auf einer 96-Well Platte ausgesät und in Abwesenheit oder Anwesenheit von 0,2 μ M MG132 über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Anschließend wurde die SBFP2-Fluoreszenz mittels Fluorometer quantifiziert. Anhand der Fluoreszenzdaten konnte ein Z-Wert von 0,59 bestimmt werden, der damit über dem für ein Screeningsystem geforderten Z-Wert von 0,5 liegt. (Abb. 4.18 A).

4.3. Etablierung eines multifluoreszenten Screening-Assays

Vor dem Hintergrund, dass zur Herstellung der drei vorgestellten Zelllinien-basierten Screening-Assays fluoreszierende Reporterproteine mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften verwendet wurden, bot sich die Etablierung eines multifluoreszenten Testsystems an. Solch ein System sollte es gestatten, die Wirkung einer Testverbindung auf mehrere Wirkstoff-Targets zeitgleich zu analysieren. Die erfolgreiche Entwicklung des multifluoreszenten Assays erfolgte gegen Ende dieser Arbeit und wurde, wie in Abbildung 4.19 dargestellt, durch einfache Ko-Kultivierung aller drei Zelllinien erreicht. Das optimale Zellaussaatverhältnis zur Etablierung des multifluoreszenten Assays betrug 1:2:1 ($293T^{\text{Vif TetOff/EYFP-A3G}}$: $293T^{\text{ODD-SBFP2}}$: $\text{HeLa}^{\text{DsREDmonomerTetOff}}$).

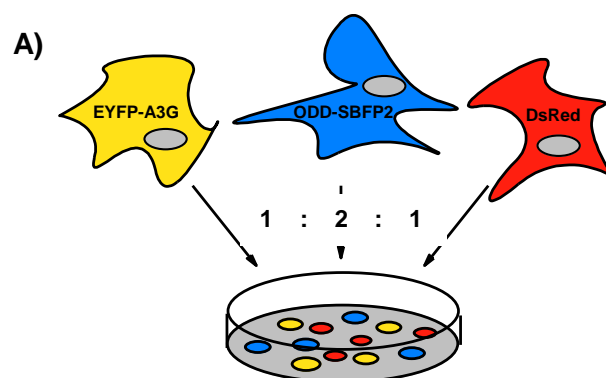


Abbildung 4.19: Beschreibung auf der nächsten Seite.

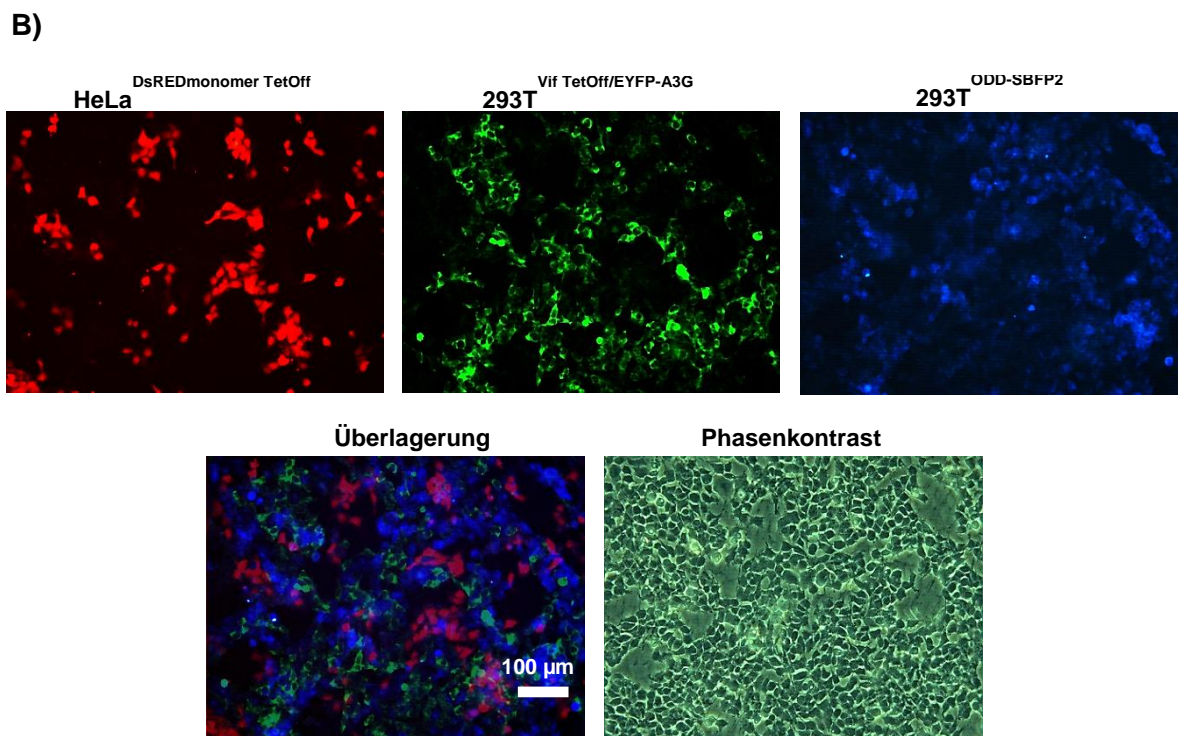


Abbildung 4.19: Etablierung des multifluoreszenten Screening-Assays. (A, vorherige Seite) Schematische Darstellung des multifluoreszenten Screening-Assays. Die angegebenen Nummern stehen für das Aussaatverhältnis der drei Zelllinien. (B) Die drei Zelllinien $293T^{Vif\ TetOff/EYFP-A3G}$, $HeLa^{DsREDmonomerTetOff}$ und $293T^{ODD-SBFP2}$ wurden zusammen ausgesät und für 24 h in Gegenwart von 0,1 ng/mL Doxycyclin kultiviert. Nachfolgend wurde das Doxycyclin-haltige Medium gegen Doxycyclin-freies Medium mit 0,1 µM MG132 ausgetauscht und die Zellen für weitere 18 h inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen

Zusätzlich zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung erfolgte noch eine fluorometrische Analyse des multifluoreszenten Assays. Es galt abzuklären, ob eine Ko-Kultivierung der drei Zelllinie einen Einfluss auf deren individuellen Leistungseigenschaften, wie die Induzierbarkeit, hat. Es wurden dazu Zellen aller drei Zelllinien auf eine 48-Well Kulturplatte ausgesät und in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Doxycyclin ko-kultiviert. Zusätzlich zu Doxycyclin wurde als weitere Kontrollsubstanz MG132 verwendet (siehe Abb. 4.20).

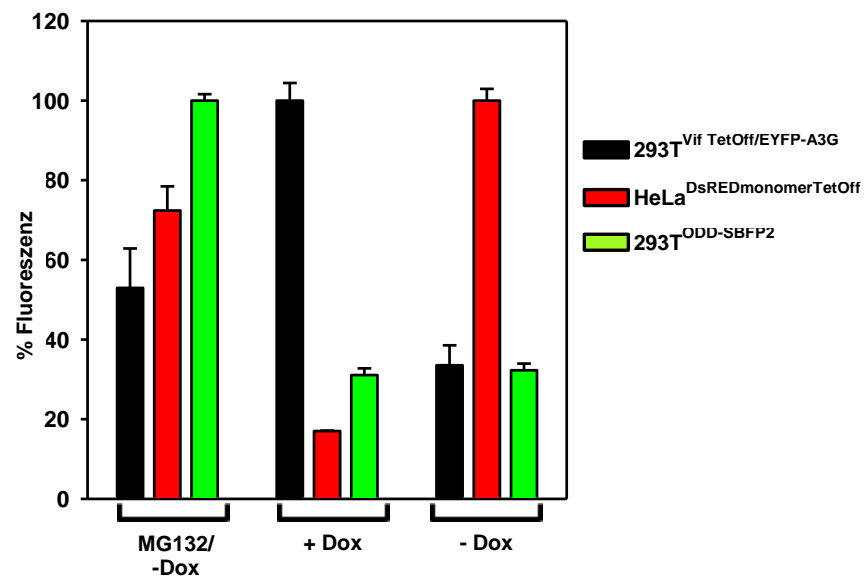


Abbildung 4.20: Charakterisierung des multifluoreszenten Screening-Assays. Nach Aussaat der 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}, 293T^{ODD-SBFP2} und HeLa^{DsREDmonomerTetOff} Zellen im Verhältnis von 1:2:1 auf eine 48-Well Kulturplatte wurden diese für 24 h in Gegenwart von 1 ng/mL Doxycyclin weiterkultiviert. Anschließend wurde das Aussaatmedium mit frischem DMEM-Vollmedium ausgetauscht, das mit 0,5% DMSO sowie 1 ng/mL Doxycyclin (+ Dox) und 0,5% DMSO sowie keinem Doxycyclin (-Dox) und 0,2 µM MG132 sowie keinem Doxycyclin (MG132/-Dox) versetzt war. Es folgte eine weitere Inkubation für 24 h. Nachfolgend wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate fluorometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD einer Dreifachbestimmung.

Wie die Ergebnisse zeigen, resultierte aus der Behandlung mit MG132 ein mehr als 3-facher Anstieg des ODD-SBFP2 Levels im Vergleich zu den anderen Proben (-Dox, + Dox). Diese Beobachtung ist konform mit Daten der Charakterisierung der 293T^{ODD-SBFP2}-Zellen (Abb. 4.17 A), wo die Zugabe von 0,2 µM MG132 zum Kulturmedium einen 3,5-fachen Anstieg des ODD-SBFP2-Niveaus bewirkte. Darüber hinaus bewirkte MG132 im vorliegenden Experiment einen Anstieg des EYFP-A3G Signals um 20 % im Vergleich zur +Dox-Probe. Die Ergebnisse zeigen weiterhin eine klare Induzierbarkeit der TetOff regulierten Expression von DsREDmonomer als auch des Vif induzierten EYFP-A3G Abbaus. Allgemein demonstrieren die Resultate, dass es möglich ist einen multifluoreszenten Assay durch einfache Ko-Kultivierung der drei Zelllinie zu etablieren. Die Pilotstudie zur Nutzung des multifluoreszenten Assay erfolgte im 48-Well Format. Versuche im 96-Well Format erbrachten bislang noch keine befriedigenden Ergebnisse. In der Regel lagen die Signalstärken der einzelnen Reporterproteine, und hier besonders die von SBFP2, nahe der Nachweisgrenze des zur Messung verwendeten Fluorometers.

4.4. Etablierung eines auf der BiFC-Technik basierenden Testsystems zur quantitativen Analyse der Vif-ElonginC-Interaktion

In Ergänzung zu den Zelllinien-basierten Screeningsystemen wurde in der vorliegenden Arbeit ein zelluläres Testsystem zur Visualisierung und Quantifizierung der Interaktion zwischen dem humanem ElonginC (EloC) und einem die Aminosäuren 138-192 umfassenden C-terminalen Vif-Fragments entwickelt (Abb. 4.21). Neben der für die Interaktion mit ElonginC notwendigen BC-Box (aa144-155) beherbergt das Vif-Fragment noch die für die Oligomerisierung wichtige Aminosäureregion P¹⁶¹LLP¹⁶⁴. Besagtes Testsystem basiert auf der bereits in der Einleitung beschriebenen bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Als Fluoreszenzreporter wurde das gelb fluoreszierende Protein Venus, eine Variante von EYFP, verwendet.

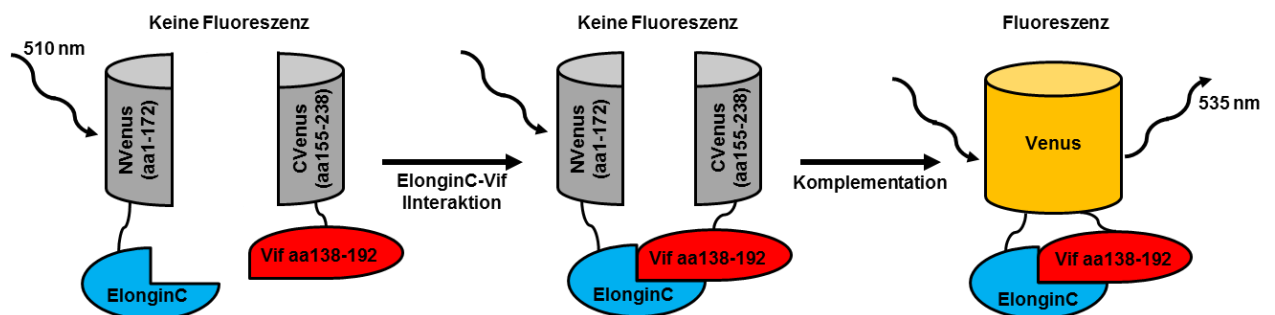


Abbildung 4.21: Funktionsweise des BiFC-Assays. Der BiFC-Assay visualisiert die direkte Interaktion zwischen humanem ElonginC und einem C-terminalen Vif-Fragment und kann damit auch für die Identifizierung von Interaktionsinhibitoren genutzt werden.

Zur Klonierung der für das BiFC-Testsystem notwendigen Expressionskonstrukte (Abb. 4.22) wurde pIRESpuro als Ausgangsvektor verwendet. Um eine optimale intramolekulare Flexibilität der beiden Fusionspartner innerhalb des Fusionsproteins zu gewährleisten, wurden flexible Peptidlinker eingefügt. Beim ElonginC BiFC-Konstrukt (NV-EloC) bestand die Peptidbrücke aus einem 30 Aminosäuren langen GS-Linker (Lu et al., 2008) und im Fall des Vif BiFC Konstrukts (CV-Vif192) aus dem bereits beschriebenen 18 Aminosäuren langen Large Linker (LL).

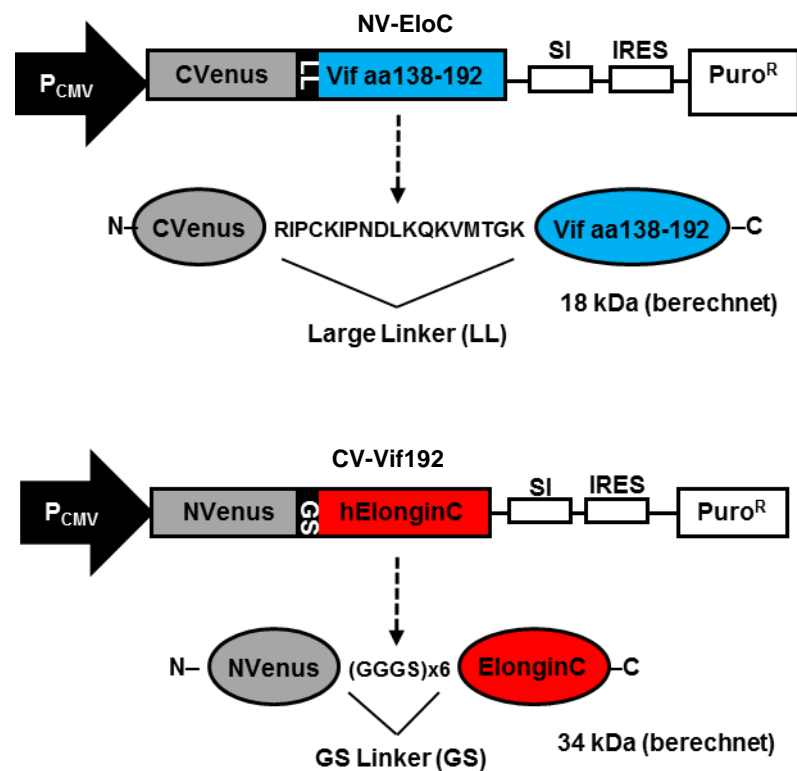


Abbildung 4.22: Schematische Darstellung der BiFC Expressionskonstrukte mit den entsprechenden Expressionsprodukten. P_{CMV}, Promoter des Cytomegalovirus; kDa, Kilo Dalton; SI, synthetisches Intron; IRES, interne Ribosomen Bindungsstelle; Puro^R, Puromycin-Resistenz.

4.4.1. Bestimmung der Spezifität des BiFC-Assay

Im Idealfall wird die Fluoreszenzkomplementation nur durch die spezifische Wechselwirkung der zu untersuchenden Interaktionspartner getrieben. Wie jedoch belegt werden konnten, ist die Fluoreszenzkomplementation unter Realbedingungen zu einem gewissen Anteil das Ergebnis einer spontanen Assoziation beider nicht-fluoreszierender Reporterproteinfragmente (Kerppola, 2006). Aus diesem Grund ist es von äußerster Wichtigkeit, die Spezifität eines jeden BiFC-Assays vor dessen Einsatz für Studien von Protein-Protein-Interaktion mittels geeigneter Kontrollen, idealerweise mit interaktionsdefizienten Mutanten der zu analysierenden Zielproteine, zu evaluieren. Die Bestimmung der Spezifität des vorliegenden BiFC-Testsystems erfolgte unter Verwendung der bereits andernorts charakterisierten Vif BC-box Mutanten L145A, A149C und A149L sowie der ElonginC-Doppelmutante A100S/L103S (Yu et al., 2004). Die Vif-Mutante L145A, A149L als auch die ElonginC-Mutante sind nicht mehr dazu befähigt einen Interaktionskomplex auszubilden. Die Vif-Mutante A149C ist hingegen nicht in ihrer Interaktion mit ElonginC beeinträchtigt. Weiterhin wurde auch die

bisher noch nicht charakterisierte Vif BC-box Mutanten V142G mit in die Evaluierung einbezogen. Wie gezeigt werden konnte, ist die Aminosäure Valin an Position 142 maßgeblich an der Interaktion von Vif mit ElonginC beteiligt (Stanley et al., 2008). Es ist zu vermuten, dass eine Substitution von Valin an dieser Position die Ausbildung des Interaktionskomplexes negativ beeinflusst.

Für den Spezifitätsnachweis wurden HEK293T-Zellen transient mit den entsprechenden Kombinationen an BiFC-Expressionskonstrukten ko-transfiziert. Zusätzlich wurde das für DsREDmonomer kodierende Plasmid pDsREDmonomer als interne Transfektionskontrolle und für die spätere Normalisierung der Komplementationssignale der einzelnen Proben in die Zellen eingebracht. Wie Vorversuchen ergaben, hatte die Ko-Expression von DsREDmonomer keinen Einfluss auf die Komplementationsreaktion (Daten nicht gezeigt). Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion erfolgte die Messung der durch Venus und DsREDmonomer emittierten Fluoreszenz mittels Fluorometer (Abb. 4.23 A). Um auszuschließen, dass Unterschiede in der Fluoreszenzkomplementation das Ergebnis differierender Proteinexpressionsniveaus sind, wurde parallel zur Fluorometeranalyse die Expression der eingebrachten BiFC-Konstrukte über eine Western Blot Analyse quantifiziert (Abb. 4.23 B).

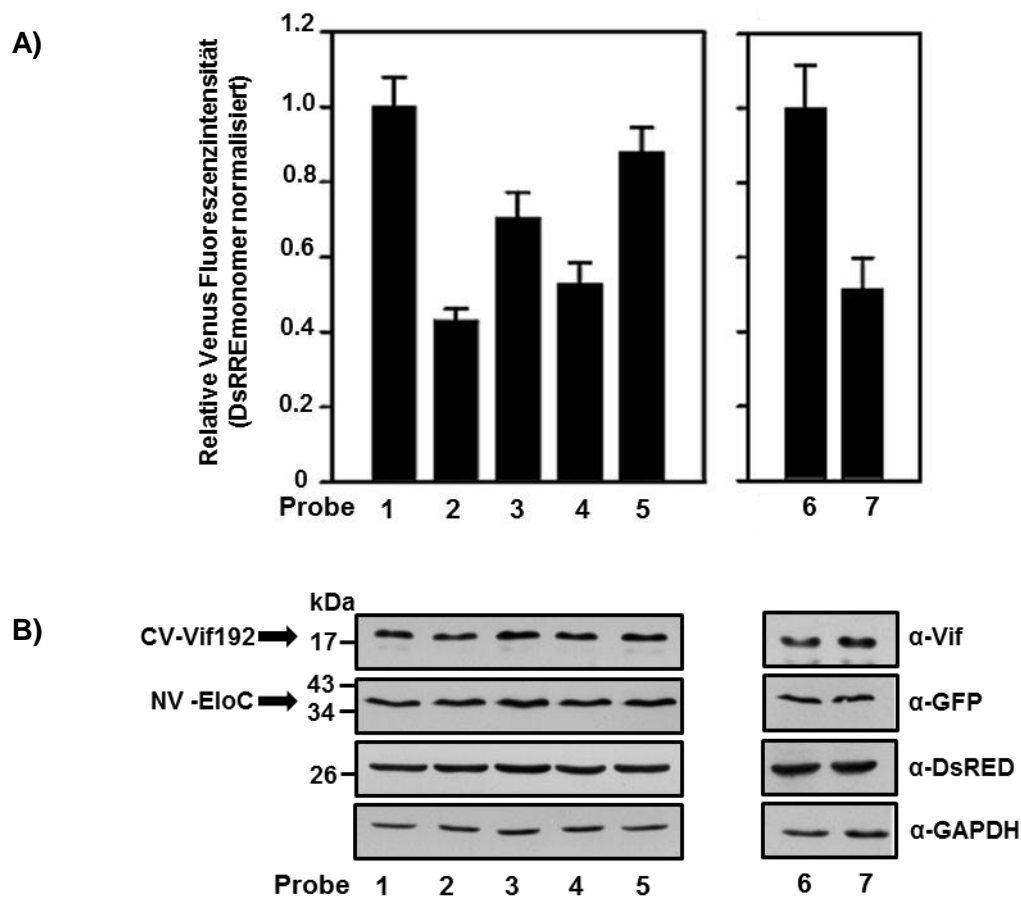


Abbildung 4.23 (vorherige Seite): Der BiFC-Assay misst spezifisch die direkte Interaktion zwischen dem C-terminalen Vif-Fragment (aa 138 bis 192) und dem Vollängen ElonginC-Protein. HEK293T-Zellen wurden transient mit gleichen Mengen an NVenus- und CVenus-Konstrukt ko-transfiziert (Probe 1, NV-EloC wt + CV-Vif192 wt; Probe 2, NV-EloC wt + CV-Vif192 L145A; Probe 3, NV-EloC wt + CV-Vif192 V142G; Probe 4, NV-EloC wt + CV-Vif192 A149L; Probe 5, NV-EloC wt + CV-Vif192 A149C; Probe 6, NV-EloC wt + CV-Vif192 wt; Probe 7, NV-EloC A100S/L103S + CV-Vif192 wt). Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen abgelöst und mittels Fluorometer (**A**) oder Western Blot (**B**) analysiert. In allen Experimenten wurde als interne Kontrolle das Plasmid pDsREDmonomerN1 ko-transfiziert. Das Venus-Signal wurde mit dem DsREDmonomer-Signal korrigiert und das Fluoreszenzsignal der Kombination NV-EloC wt /CV-Vif192 wt auf 1 gesetzt. In (**A**) sind die Mittelwerte \pm SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen, jeweils durchgeführt als Sechsfachbestimmung, dargestellt.

Wie die Ergebnisse der Western Blot Analyse (Abb. 4.23 B) zeigen, gab es keine Unterschiede zwischen den Expressionsniveaus der einzelnen Transfektionen. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede in der Intensität der Komplementationssignale durch eine ungleiche Expression der BiFC-Konstrukte verursacht wurden. Darüber hinaus konnten alle BiFC-Fusionskonstrukte beim vorhergesagten Molekulargewicht detektiert werden. Angezeigt durch ein im Vergleich zum wildtypischen Vif-Fragment niedrigeres Komplementationssignals, waren alle Vif-Mutanten in ihrer Fähigkeit mit ElonginC zu interagieren beeinträchtigt (siehe Abb. 4.23 A). Den stärksten Effekt zeigte sich für die L145A Mutante. Hier war das Venus-Signal um den Faktor ~ 2 reduziert. Des Weiteren zeigte die Fluorometeranalyse, dass die ElonginC-Doppelmutante A100S/L103S in einem ähnlichen Maße wie die Vif L145A Mutanten in ihrem Interaktionsverhalten beeinträchtigt war.

Im Anschluss an die Feststellung der Spezifität wurde der BiFC-Assay an das 96-Well Plattenformat angepasst und der Z-Faktor bestimmt. Wie die Ergebnisse in Abbildung 4.24 zeigen, erreichte der BiFC-Assay unter den gegebenen Versuchsbedingungen einen Z-Faktor von lediglich 0,35, was bedeutet, dass der BiFC-Assay ohne weitere Optimierungsmaßnahmen vorerst nicht für die Substanzsuche im Hochdurchsatzverfahren einsetzbar ist.

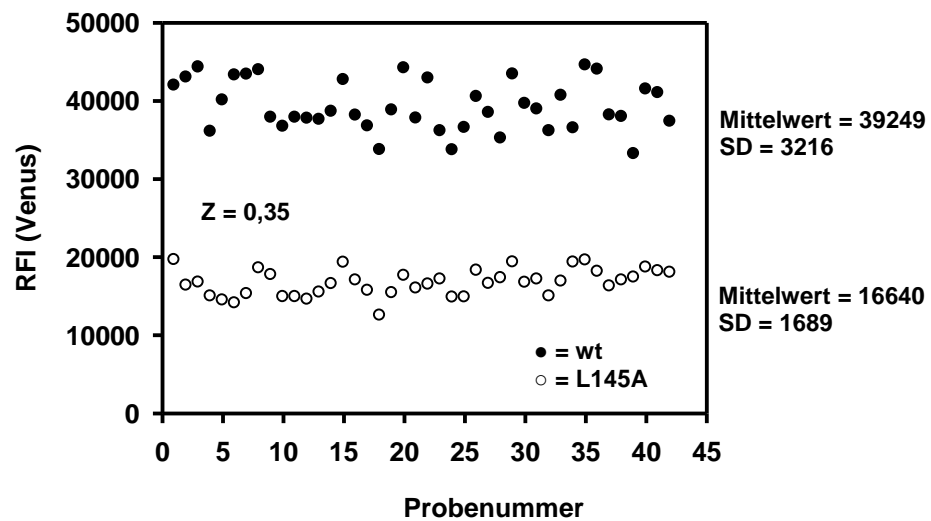


Abbildung 4.24: Bestimmung des Z-Faktors für den Vif-ElonginC BiFC-Assay. HEK293T-Zellen wurden in eine 96-Well Kulturplatte ausgesät und transient mit den BiFC-Konstruktkombinationen NV-EloC(wt)/CV-Vif192(wt) und NV-EloC(wt)/CV-Vif192(L145A) als auch pDsREDmonomerN1 als interne Kontrolle ko-transfiziert. Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen lysiert und sowohl die Venus-Fluoreszenz als auch die DsREDmonomer-Fluoreszenz mittels Fluorometer quantifiziert. Das Venus-Signal wurde mit dem DsREDmonomer-Signal korrigiert und graphisch dargestellt. SD, Standardabweichung; RFI, Relative Fluoreszenzintensität;

4.4.2. Weitergehende Charakterisierung der Vif BiFC-Konstrukte

Zur weiteren Charakterisierung der Vif BiFC-Konstrukte wurde ein Kompetitionsassay durchgeführt. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit den Vektoren, die für EYFP-A3G, wildtypisches Vollängen (VL) Vif-Protein und CV-Vif192 (wt und 145A) kodieren, transient transfiziert und 48 h später die Proteinexpression mittels Western Blot analysiert. Es galt die Annahme, dass das Vollängen Vif-Protein mit CV-Vif192 wt um die Interaktion mit endogenem ElonginC konkurriert und damit verbunden der Abbau von EYFP-A3G gestört wird. Das CV-Vif192 L145A Konstrukt sollte in diesem Zusammenhang zu keiner Hemmung der EYFP-A3G Degradation führen.

Wie in Abbildung 4.25 A zu erkennen ist, führte die Ko-Expression von CV-Vif192 wt zu einer Hemmung der Degradation von EYFP-A3G, wohingegen die Ko-Expression der CV-Vif192 Mutante L145A keine Inhibition des A3G-Abbaus bewirkte. Ein unerwartetes Ergebnis des Kompetitionsassays war, dass es neben der Hemmung des EYFP-A3G Abbaus auch zu einer verminderten Expression des Vollängen Vif-Proteins kam. Dieser Effekt konnte bei Ko-

Expression von CV-Vif192 L145A nicht beobachtet werden. Um abzuklären, ob die Inhibition der Vif Expression alleinig durch die Ko-Expression von CV-Vif192 wt verursacht wird, wurden HEK293T-Zellen mit den für CV-Vif192 wt und VL Vif kodierenden Expressionsvektoren transient ko-transfiziert. Als Kontrolle diente der CV-Vif192 L145A Expressionsvektor als auch ein Plasmid, das nur für das C-terminale Fragment von Venus kodiert. Auch hier bewirkte die Ko-Expression von CV-Vif192 wt eine Reduktion des Expressionsniveaus von Vif, welche hingegen in Gegenwart von CV-Vif192 L145A nicht beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 4.25 B).

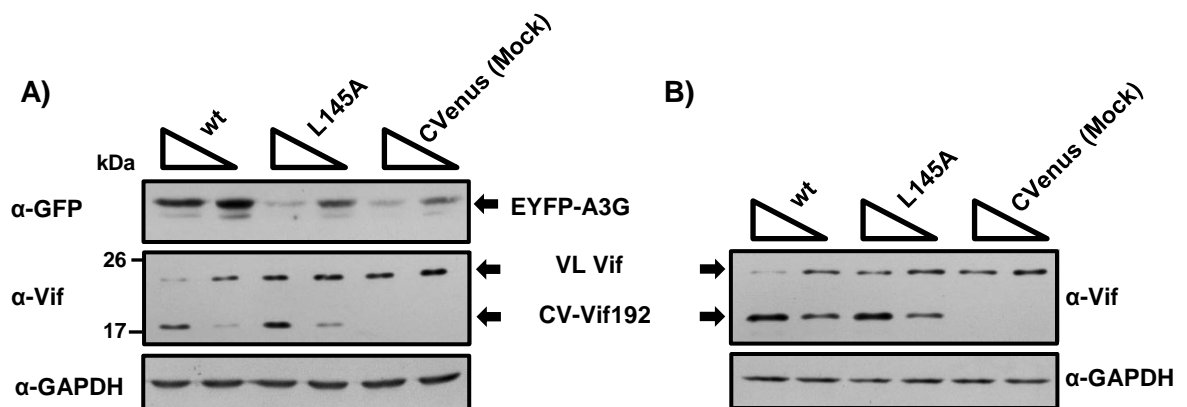


Abbildung 4.25: Der Vif induzierte Abbau von EYFP-A3G wird durch die Ko-Expression des wildtypischen BiFC Vif-Konstrukt inhibiert. (A) HEK293T-Zellen wurden transient mit den für Vif (wt), EYFP-A3G, CV-Vif192 (wt), CV-Vif192 (L145A) und CVenus (Mock) kodierenden Expressionsplasmiden ko-transfiziert. Nach 48h wurden die transfizierten Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert. VL, Volllänge; wt, Wildtyp.

Die in Abbildung 4.25 dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Störung der Wechselwirkung von VL Vif mit ElonginC durch das Vif Fragment eine Destabilisierung von VL Vif zur Folge hat und darüber eine Inhibition der A3G-Degradation bewirkt wird.

Zur Bestätigung der im Kompetitionsassay gewonnenen Daten wurde das Expressionsniveau von wildtypischen Vollängen Vif und der Vollängen Vif BC-Box Mutante L145A im Zellkulturversuch untersucht (Abbildung 4.26). Dazu wurden HEK293T-Zellen mit gleichen Mengen der für Vif und Vif L145A kodierenden Expressionsplasmide transient transfiziert und die Proteinexpression mittels Western Blot analysiert. Um die Frage zu klären, ob eine eventuell auftretende Destabilisierung der Vif-Mutante mit der Funktion des Proteasoms assoziiert ist, wurde ein Teil der transfizierten Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt.

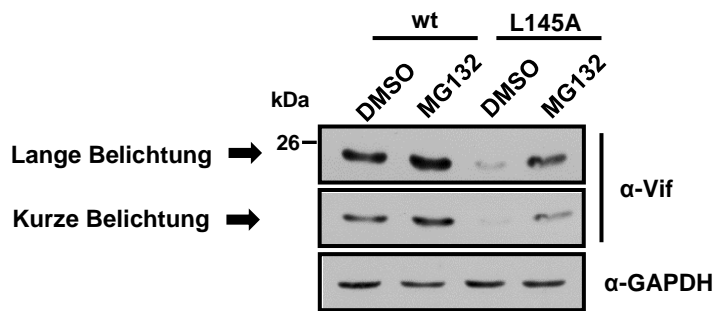


Abbildung 4.26: Eine Mutation der Aminosäure L145 im BC-box Motif von Vif beeinflusst dessen Expressionsniveau. HEK293T-Zellen wurden mit gleichen Mengen (0,5 µg/Vertiefung einer 6-Well Kulturplatte) an Expressionsplasmiden, die für wildtypisches (wt) Vif und die Vif-Mutante L145A kodieren transient transfiziert. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht, das mit 0,2 µM MG132 oder 0,5% DMSO versetzt war. Nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen für weitere 18 h kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen aufgeschlossen und es folgte die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in den Lysaten. Gleiche Mengen an Gesamtprotein wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit der Western Blot Methode analysiert.

Wie die Ergebnisse der Western Blot Analyse belegen, war die Expression der Vif BC-Box Mutante im Vergleich zur Wildtypform deutlich vermindert. Die Behandlung mit MG132 resultierte in einer Anreicherung der Mutante als auch des wildtypischen Vif-Proteins, wobei der Proteasominhibitor einen stärkeren Effekt auf das Expressionsniveau von Vif L145A hatte. Die Ergebnisse sind ein erster Hinweis darauf, dass die BC-Box eine wichtige Rolle bei der zellulären Stabilität von Vif spielt .

4.5. Substanzscreening

4.5.1. Analyse von RN-18 Derivaten

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit bestand in der Analyse von RN-18 Derivaten mit dem primären Ziel, Verbindungen mit erhöhter Wirksamkeit zu identifizieren. RN-18 als auch dessen Derivate wurde von der Arbeitsgruppe Schirmeister bereitgestellt. Die Analyse der Derivate erfolgte mittels der drei vorgestellten Zelllinie-basierten Assays in separaten Versuchen (Abb. 4.27) und nicht im multifuoreszenten Screeningformat. Es wurde weiterhin die Zytotoxizität aller Derivate und RN-18 mittels MTT-Assay unter Verwendung der $293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}$ Zelllinie als Zellkultursystem bestimmt (Abb. 4.28). Für das Screening der Derivate als auch für die Zytotoxizitätsbestimmung wurde eine Substanzkonzentration von $30 \mu M$ gewählt, da bei dieser Konzentration ein Ausfallen der Substanzen nicht beobachtet wurde. Die Analyse der Derivate erfolgte im 96-Well Format.

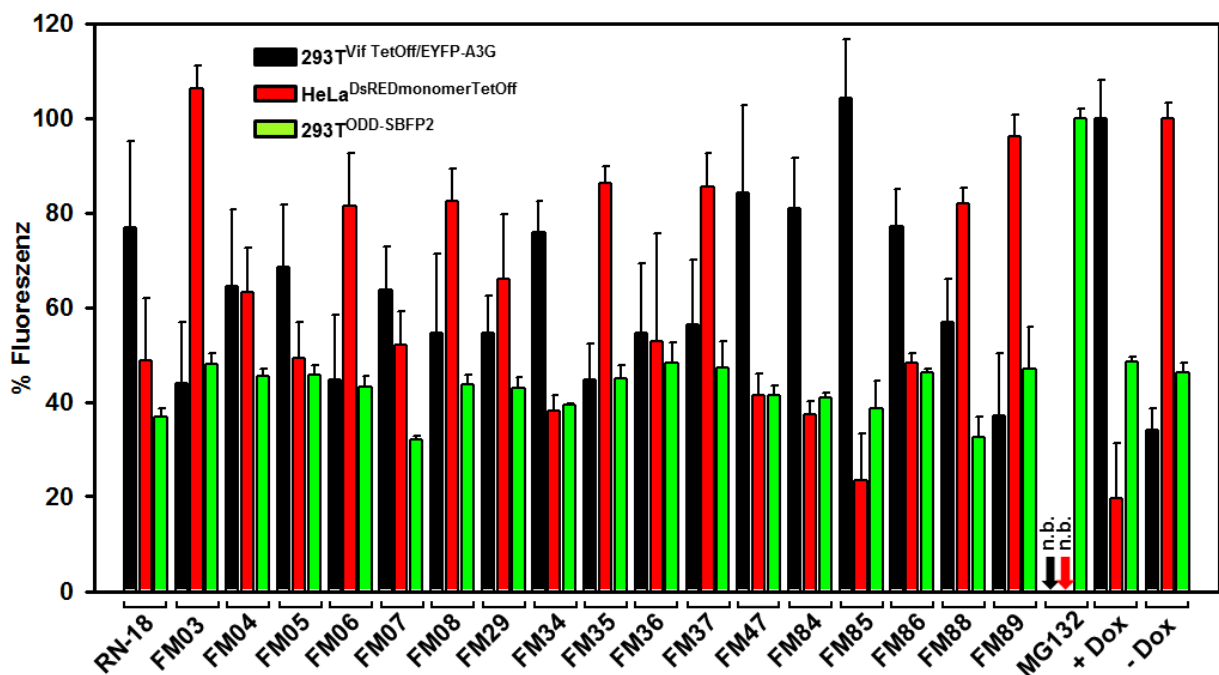


Abbildung 4.27: Analyse von RN-18 und seiner Derivate. $293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}$, $HeLa^{DsREDmonomerTetOff}$ und $293T^{ODD-SBFP2}$ -Zellen wurden separat auf einer 96-Well Kulturplatte ausgesät und nachfolgend mit den angegebenen Derivaten als auch RN-18 bei einer Endkonzentration von $30 \mu M$ in Abwesenheit von Doxycyclin behandelt. Als Kontrollen dienten $0,2 \mu M$ MG132, Doxycyclin-freies (-Dox) und Doxycyclin-haltiges (+Dox) Medium. Alle Proben enthielten DMSO in einer Endkonzentration von $0,5 \%$. Bei Zugabe der Substanzen bestand stets 100% Zellkonfluenz. Es folgte eine fluorometrische Analyse der Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Versuchen, jeweils durchgeführt als Vierfachbestimmung. n.b.; nicht bestimmt.

Die in Abbildung 4.27 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass FM85 weit stärker als RN-18 den Abbau von EYFP-A3G inhibierte. Eine Behandlung mit FM85 resultierte im Vergleich zur Kontrolle (+ Dox) in einer vollständigen Hemmung der A3G-Depletion. Verglichen mit RN-18 zeigten alle weiteren Substanzen gleiche (FM34, FM47, FM84, FM86), geringere (FM03, FM04, FM05, FM06, FM07, FM08, FM29, FM35, FM36, FM37, FM88) oder keine (FM89) inhibitorische Wirkung auf die EYFP-A3G Degradation. Überraschenderweise hemmten alle im A3G-Abbau als wirksam identifizierte Verbindungen auch die TetOff-regulierte Expression von DsREDmonomer. Im Vergleich zur MG132 Kontrolle bewirkte keines der Derivate einen Anstieg des ODD-SBFP2 Signals, was darauf schließen lässt, dass von keinem Derivat eine Hemmwirkung auf den zellulären proteasomalen Proteinabbau ausging.

Beim Vergleich der mittels $293T^{Vif\ TetOff/EYFP-A3G}$ und $HeLa^{DsREDmonomerTetOff}$ -Zelllinie gewonnenen Daten wird ersichtlich, dass die DsREDmonomer Expression meist negativ mit der Inhibition der EYFP-A3G Degradation korreliert. Besonders deutlich ist dies im Fall von FM85, FM86 und FM88.

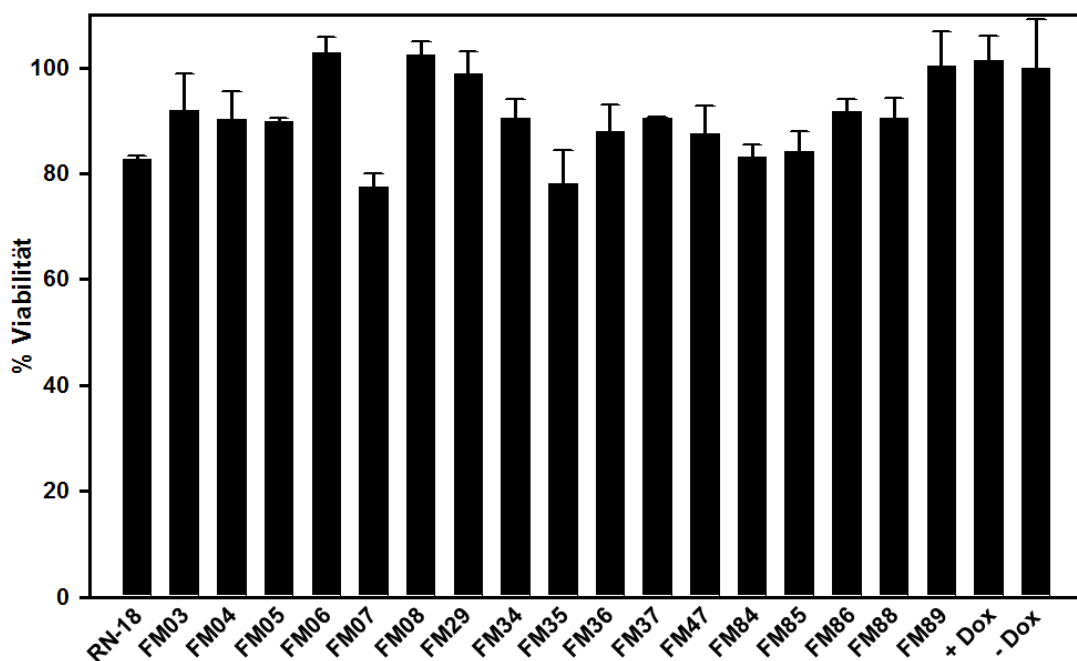


Abbildung 4.28: Bestimmung der Zytotoxizität von RN-18 und dessen Derivate. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden $293T^{VifTetOff/EYFP-A3G}$ -Zellen auf einer 96-Well Kulturplatte ausgesät. Es folgte nach 48 h Inkubation die Zugabe der Derivate als auch RN-18 bei einer Endkonzentration von 30 μ M in Abwesenheit von Doxycyclin. Als Kontrollen dienten Doxycyclin-freies (-Dox) und Doxycyclin-haltiges (+Dox) Medium. Alle Proben enthielten DMSO in einer Endkonzentration von 0,5 %. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Assay 24 h Stunden nach Zugabe der Substanzen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Versuchen, jeweils durchgeführt als Vierfachbestimmung.

Die Ergebnisse der MTT-Analyse (Abb. 4.28) belegen, dass eine Mehrheit der Derivate die Zellviabilität negativ beeinflusste, wobei FM07 und FM35 mit einer Reduktion von mehr als 20% gegenüber den Kontrollen (+Dox, -Dox) den größten Effekt zeigten. Ein unerwartetes Ergebnis betraf die Reduktion der Viabilität durch RN-18 um bis zu 20%.

4.5.2. RN-18 hemmt die TetOff-regulierte Genexpression

Als ein wichtiges Ergebnis der vorhergehenden fluorometrischen Analyse (Abb. 4.27) konnte ermittelt werden, dass RN-18 die TetOff-regulierte Expression von DsREDmonomer hemmt als auch einen Anstieg des EYFP-A3G Niveaus bewirkt. Basierend auf diesen Ergebnissen galt die Vermutung, dass RN-18 ebenfalls die TetOff-regulierte Expression von Vif hemmt und damit verbunden zu einer scheinbaren Inhibition des Vif induzierten EYFP-A3G Abbaus führt. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde in einem nachfolgenden Versuchsansatz die Expression der Reportergene als auch die von Vif auf Proteinebene mittels Western Blot Methode analysiert. Als Kontrollsubstanz diente FM03. Die Wahl von FM03 als Kontrolle begründet sich damit, dass es so gut wie keine Wirkung auf die DsREDmonomer und ODD-SBFP2 Expression noch auf den Vif induzierten A3G Abbau zeigte. Ein weiteres Auswahlkriterium war seine chemische Struktur, die nur in der Position einer Seitengruppe von RN-18 abweicht (Abb. 4.29). Zusätzlich wurden MG132 und PYR41 als Inhibitoren des Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Proteinabbaus eingesetzt.

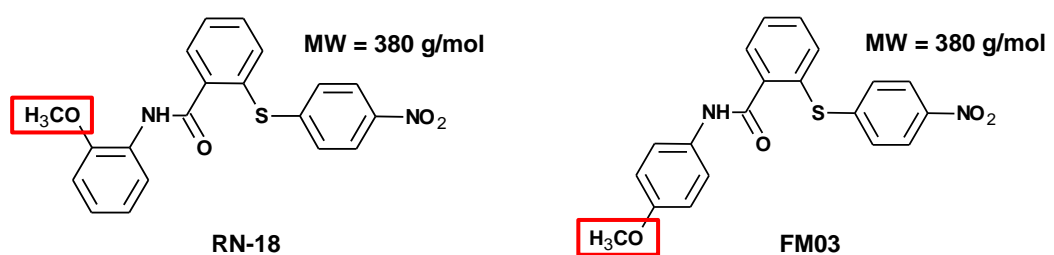


Abbildung 4.29: Chemische Struktur von RN18 und FM03. MW, Molekulargewicht.

Wie die Ergebnisse der Western Blot Analyse in Abbildung 4.30 A zeigen, hemmte RN-18, wie auch schon in der Fluoreszenzanalyse gezeigt (Abb. 4.27), deutlich die TetOff-regulierte Expression von DsREDmonomer. Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich bei Analyse der 293T^{VifTetOff/EYFP-A3G} Zellextrakte. Hier wurde ebenfalls die TetOff-regulierte Genexpression, in

diesem Fall von Vif, durch RN-18 inhibiert. Dies betätigt die Annahme, dass der Anstieg des EYFP-A3G Niveaus durch eine Hemmung der TetOff-regulierten Vif-Expression verursacht wurde. FM03 hingegen hatte keine nachweisbare Wirkung auf die TetOff-regulierte Genexpression, den Abbau von EYFP-A3G oder den proteasomalen Abbau von ODD-SBFP2. Wie erwartet, hemmten MG132 und PYR41 die Degradation von ODD-SBFP2, wobei MG132 weit effektiver wirkte. Wie auch schon im Rahmen der Charakterisierung der 293T^{VifTetOff/EYFP-A3G} Zelllinie gezeigt werden konnte (Abb. 4.12), inhibierte PYR41 in besonderem Maße den Abbau von EYFP-A3G bei gleichzeitig nicht nachweisbarem Effekt auf die TetOff-regulierte Vif-Expression.

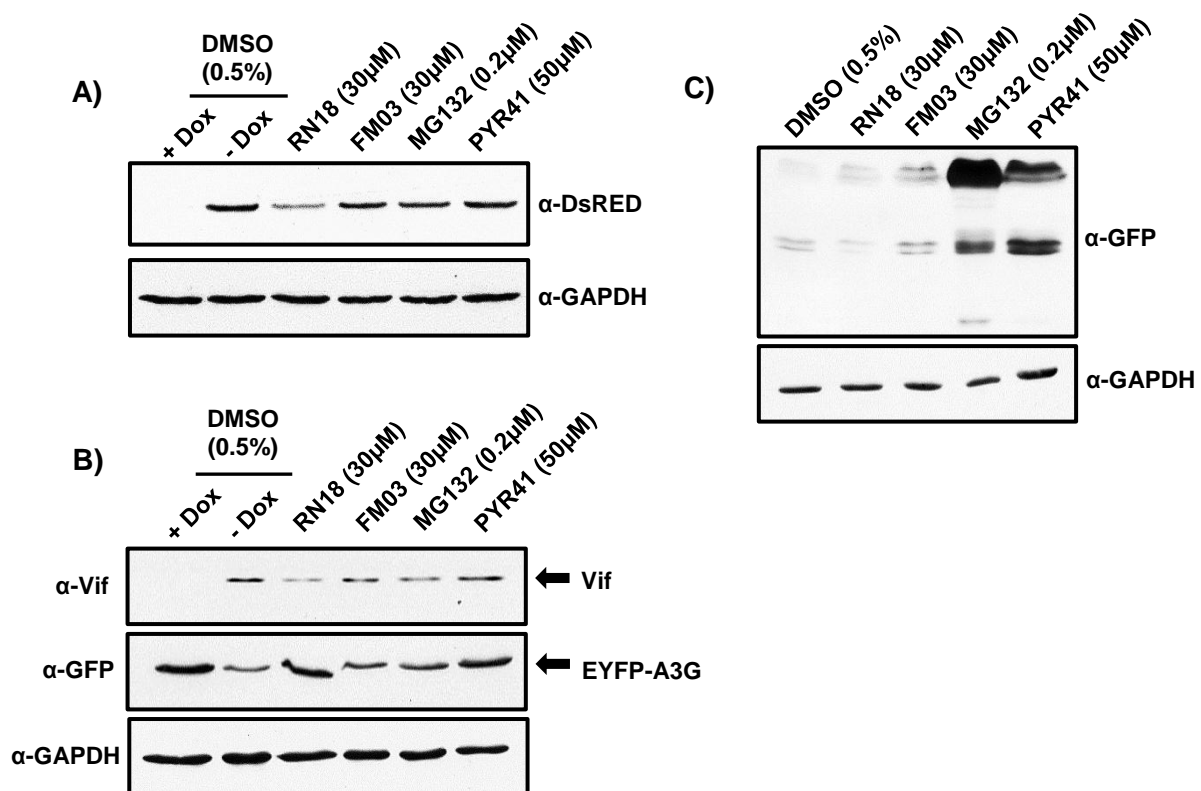


Abbildung 4.30: RN-18 inhibiert die TetOff-kontrollierte Expression von DsREDmonomer und Vif. HeLa^{DsREDmonomerTetOff} (A), 293T^{VifTetOff/EYFP-A3G} (B) und 293T^{ODD-SBFP2} (C) Zellen wurden auf eine 6-Well Kulturplatte ausgesät und anschließend in Abwesenheit (293T^{ODD-SBFP2}-Zelllinie) oder Anwesenheit (TetOff-Zelllinien) von 1 ng/mL Doxycyclin für 48 h kultiviert. Nachfolgend wurde das Aussaatmedium gegen frisches Doxycyclin-freies DMEM-Vollmedium ausgetauscht, welches mit den entsprechenden Substanzen versetzt war. Zur internen Kontrolle wurden Zellen in Abwesenheit und Anwesenheit von 1 ng/mL Doxycyclin kultiviert. Alle Proben enthielten DMSO in einer Endkonzentration von 0,5 %. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und der Gesamtproteingehalt der Proben bestimmt. Es wurden anschließend gleiche Mengen an Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der Western-Blot-Methode analysiert.

4.5.3. RN-18 wirkt cytotoxisch

Ein weiteres Resultat in Bezug auf RN-18, das es galt zu verifizieren, war die von dieser Substanz ausgehende Zytotoxizität. Dazu wurde die Viabilitätsanalyse in größerem Umfang mit RN-18 und FM03 sowie DMSO als Negativkontrolle wiederholt. Anstelle der $293T^{VifTetOff/EYFP-A3G}$ -Zellen wurden hier herkömmliche HeLa und HEK293T-Zellen für den MTT-Assay verwendet. Die ermittelten Viabilitätswerte wurden unter Verwendung des T-Tests (two-tailed paired) statistisch ausgewertet und sind nachfolgend in Abbildung 4.31 dargestellt.

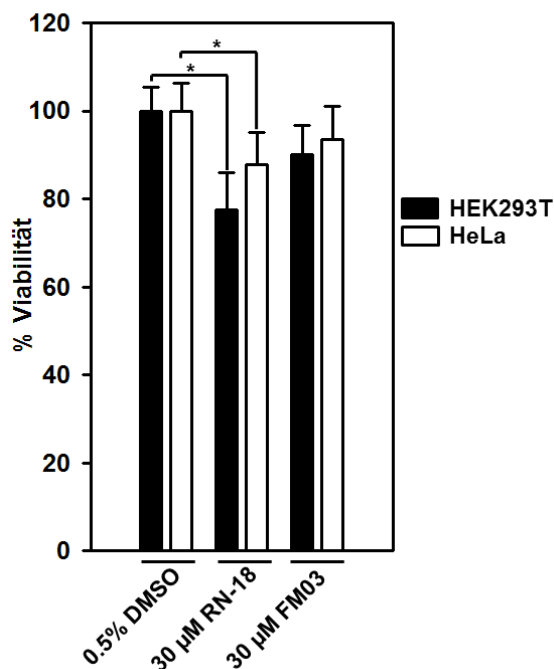


Abbildung 4.31: RN-18 ist cytotoxisch. Zur Bestimmung der Cytotoxizität von RN-18 und FM03 wurden HEK293T-Zellen (20000 Zellen/Vertiefung/0,1mL) und HeLa-Zellen (10000 Zellen/Vertiefung/0,1mL) auf eine 96-Well Kulturplatte ausgesät und für 24 h weiterkultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,1 mL DMEM-Vollmedium mit DMSO, RN-18 oder FM03 und eine Inkubation für 24 h. Nachfolgend wurde die Zellviabilität mittels MTT-Test bestimmt und die erhaltenen Viabilitätsdaten statistisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von fünf unabhängigen Versuchen, jeweils durchgeführt als Achtfachbestimmung.* $P < 0,05$.

Wie die Daten in Abbildung 4.31 erkennen lassen, führte die Behandlung mit RN-18 im Vergleich zur DMSO Kontrolle zu einer signifikanten Verringerung der Zellviabilität, im Mittel um mehr als 20% bei den HEK293T-Zellen und 15% im Fall der HeLa-Zellen. Auch FM03 wirkte sich hemmend auf die Zellviabilität aus, wobei der zytotoxische Effekt weniger deutlich ausfiel als für RN-18.

4.5.4. Analyse von RN-18 mit dem Multifluoreszenz-Assay

Es wurde die Aktivität von RN-18 zusätzlich unter Verwendung des Multifluoreszenz-Assays analysiert. Diese Analyse diente in der Hauptsache der weiteren Qualifizierung dieses Testformates für das Wirkstoffscreening. Die Analyseergebnisse sind in Abbildung 4.32 dargestellt. Die Analyse erfolgte im 48-Well Format.

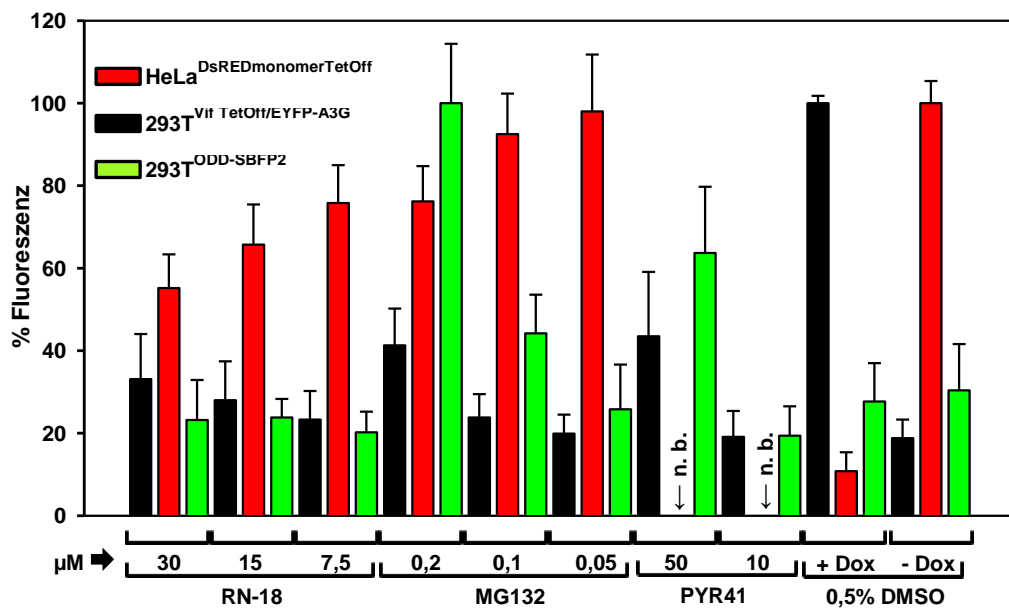


Abbildung 4.32: Analyse von RN-18 mittels des multifluoreszenten Screening-Assays. Nach Aussaat der 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G}, HeLa^{DsREDmonomerTetOff} und 293T^{ODD-SBFP2} Zellen auf eine 48-Well Kulturplatte wurden diese für 24 h in Gegenwart von 1 ng/mL Doxycyclin weiterkultiviert. Anschließend wurde das Aussaatmedium durch frisches, Doxycyclin-freies DMEM-Vollmedium ausgetauscht, das mit steigenden Mengen an RN-18, MG132 und PYR41 versetzt war. Zur internen Kontrolle wurden Zellen in Abwesenheit und Anwesenheit von 1 ng/mL Doxycyclin mit 0,5% DMSO kultiviert. Die Inkubation in Gegenwart der Kontrollen und Testsubstanzen erfolgte über einen Zeitraum von 24 h. Nachfolgend wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate fluorometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von vier unabhängigen Versuchen, jeweils durchgeführt als Dreifachbestimmung. n.b. , nicht bestimmt wegen zu hoher Autofluoreszenz von PYR41.

Die fluorometrische Analyse zeigt eine durch RN-18 verursachte dosisabhängige Inhibition der TetOff regulierte DsREDmonomer Expression. Bei einer Konzentration von 30 μM führte RN-18 zu einer Senkung des DsREDmonomer-Signals um ca. 45% gegenüber der Kontrolle (-Dox). Dieses Ergebnis geht weitestgehend konform mit den in Abbildung 4.27 gezeigten Daten, wo RN-18 die DsREDmonomer Expression um ca. 50% hemmte. Bei einer

Konzentration von mehr als 0,05 μM inhibierte in der vorliegenden Analyse auch MG132 die Expression von DsREDmonomer, jedoch in geringerem Maße als RN-18. Für PYR41 ergab sich eine starke substanzbedingte Autofluoreszenz, die das DsREDmonomer Signal überlagerte und eine Quantifizierung der Reporterfluoreszenz unmöglich machte. Im A3G-Abbauassay ($293\text{T}^{\text{Vif TetOff/EYFP-A3G}}$ -Zelllinie) führte RN-18 zu einer dosisabhängige Erhöhung des EYFP-A3G Signals. Bei 30 μM kam es zu einer nahezu Verdopplung des EYFP-Signals gegenüber der –Dox Kontrolle. Im Vergleich mit den in Abbildung 4.27 dargestellten Daten fiel der inhibitorische Effekt von RN-18 auf den EYFP-A3G Abbau jedoch weit geringer aus. Wie zu erwarten war, führten MG132 und PYR41 zu einer Hemmung der EYFP-A3G als auch ODD-SBFP2 Degradation, jeweils angezeigt durch ein erhöhtes Reporter-Signal. Im Fall von ODD-SBFP2 bewirkte MG132 einen 3-fachen und PYR41 einen 2-fachen Anstieg des Fluoreszenzsignals relativ zur DMSO-Kontrollen. Diese Werte decken sich weitestgehend mit den Ergebnissen der Charakterisierung der $293\text{T}^{\text{ODD-SBFP2}}$ Zelllinie (Abb. 4.17). Zusammenfassend demonstrieren die hier dargestellten Ergebnisse das Potential des Multifluoreszenz-Assays für das Substanzscreening. Bislang steht eine Miniaturisierung dieses Assays, sprich eine Anpassung an das 96-Well Format oder höherformatige Mikrotiterplatten noch aus.

4.5.5. Analyse von niedermolekularen Vif-ElonginC-Interaktionsinhibitoren

Wie in der Einleitung beschrieben, stellt die Interaktion zwischen Vif und ElonginC eine entscheidende Schaltstelle beim Abbau von A3G dar, was sie zu einem attraktiven Ziel für neuartige antiretrovirale Wirkstoffe macht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige niedermolekulare Vif-ElonginC-Interaktionsinhibitoren bezüglich ihrer Wirkung auf den Vif Induzierten A3G-Abbau analysiert. Das zielgerichtete Design der Inhibitoren erfolgte primär auf Basis von bereits veröffentlichten Strukturdaten eines Proteinkomplexes, bestehend aus ElonginC und ein die BC-Box umfassenden Vif-Fragmentes (Stanley et al, 2008). Design und Synthese der potentiellen Interaktionsinhibitoren erfolgte durch die Arbeitsgruppe Schirmeister.

Insgesamt 42 niedermolekulare Verbindungen konnten hergestellt werden. Die Substanzen wurden zunächst mittels der $293\text{T}^{\text{Vif TetOff/EYFP-A3G}}$ -Zelllinie auf ihre Wirksamkeit auf den A3G-Abbau hin untersucht. Zur Analyse der Verbindungen wurden die $293\text{T}^{\text{Vif TetOff/EYFP-A3G}}$ -Zellen in Gegenwart von steigenden Substanzmengen (100-6 μM) für 24 h in

Abwesenheit von Doxycyclin inkubiert und anschließend das EYFP-A3G Signal mittels Fluorometer quantifiziert. Parallel dazu erfolgte die Charakterisierung der Substanzen im Hinblick auf eine mögliche zytotoxische Wirkung unter Verwendung der MTT-Methode. Die Ergebnisse aller Substanzscreenings und Toxizitätsbestimmungen sind im Anhang unter Punkt 12.1 aufgeführt. Für etwa die Hälfte der getesteten Verbindungen konnte eine Wirkung auf die EYFP-A3G Expression nachgewiesen werden. Dabei zeigte das Gros dieser aktiven Substanzen nur bei vergleichsweise hohen Substanzkonzentrationen im Bereich von 44-100 μM eine Hemmung des A3G-Abbaus. Auffällig war, dass die Hemmung meist mit einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität einherging. Einzig die Substanzen A15, A19 und FM173 hemmten effizient die EYFP-A3G Degradation bei einer Substanzkonzentration von nur 13 μM und wiesen gleichzeitig bei dieser Konzentration nur eine Reduktion der Zellviabilität um nicht mehr als 10% auf (Abb. 4.33).

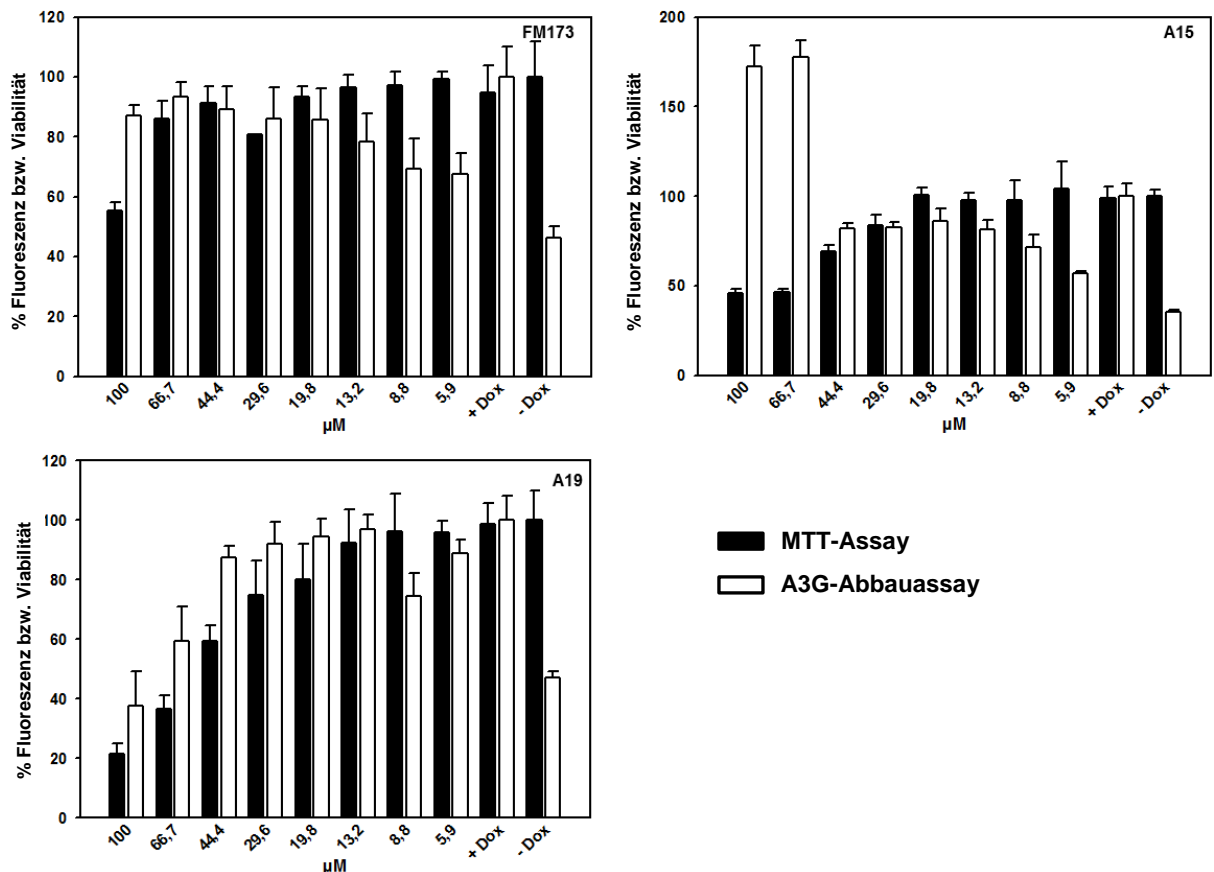


Abbildung 4.33: Ergebnisse zur Titration der Substanzen FM173, A15 und A19. Die Titration der Substanzen erfolgte unter Verwendung des A3G-Abbauassays (293T^{Vif Tet^{Off}/EYFP-A3G}-Zelllinie). Parallel dazu wurde die Toxizität mittels MTT-Assay bestimmt. Zur genauen Durchführung siehe 3.2.10 (MTT-Assay) und 3.2.12. (Substanzscreening im 96-Well Format). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD einer Vierfachbestimmung.

In einer nachfolgenden Analyse mit HeLa^{DsREDmonomerTetOff}-Zellen sollte abgeklärt werden, ob die Hemmung des A3G-Abbaus durch eine Interferenz der Substanzen mit dem TetOff-Expressionssystem verursacht wird. Wie die Analyse ergab (Abb. 4.34), hemmte bei einer Konzentration von 13 µM die Substanz A19 die DsREDmonomer Expression relativ zur -Dox Kontrolle um ~25%, A15 um ~50% und FM173 um ~80%. Diese Ergebnisse lassen eine spezifische Hemmung der Vif induzierten A3G-Degradation durch A19 vermuten.

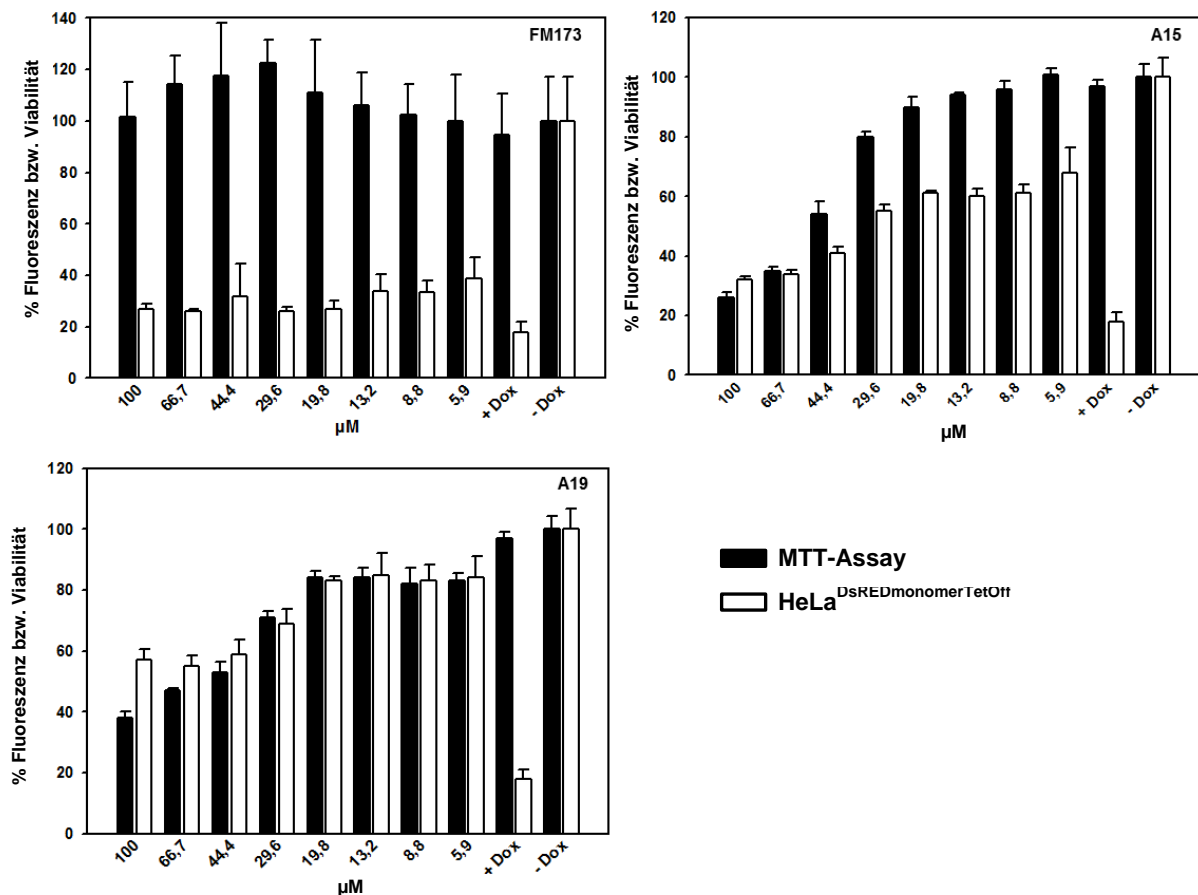


Abbildung 4.34: Titration von FM173, A15 und A19 unter Verwendung der HeLa^{DsREDmonomerTetOff}-Zelllinie. Parallel zur Fluoreszenzanalyse wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Zur genauen Durchführung siehe 3.2.10 (MTT-Assay) und 3.2.12. (Substanzscreening im 96-Well Format). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD einer Vierfachbestimmung.

Zur Bestätigung der für A19 ermittelten Daten, erfolgte eine Wiederholung der Analyse mit 293T^{VifTetOff/EYFP-A3G} und HeLa^{DsREDmonomerTetOff} Zellen. Zusätzlich dazu wurde auch abgeklärt, ob A19 mit dem Abbau des ODD-SBFP2 Fusionsproteins interferiert. Die Analysen wurden bei einer Substanzkonzentration von 10 µM und 5 µM durchgeführt (Abb. 4.35).

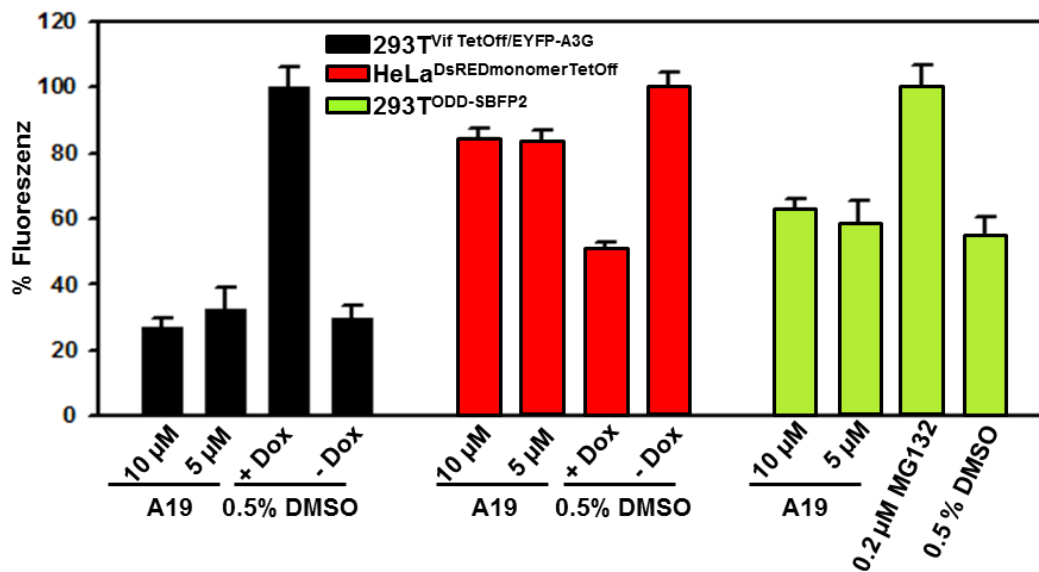


Abbildung 4.35: Analyse von A19 mittels des A3G-Abbauassays und der Kontrollassays. 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G} (A), HeLa^{DsREDmonomerTetOff} (B) and 293T^{ODD-SBFP2} (C) Zellen wurden separat auf einer 96-Well Kulturplatte kultiviert und mit den angegebenen Derivaten als auch den entsprechenden Kontrollen behandelt. Es folgte eine fluorometrische Analyse der Zellen. Zur genauen Durchführung siehe 3.2.10 (MTT-Assay) und 3.2.12. (Substanzscreening im 96-Well Format). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD einer Achtfachbestimmung.

Ein unerwartetes Ergebnis dieser Analyse war, dass A19 in der Wiederholung den Abbau von A3G nicht inhibierte, wohl aber die TetOff-regulierte Expression von DsREDmonomer um einen Wert von ~20% relativ zur -Dox Kontrolle hemmte. Des Weiteren zeigen die Daten, dass A19 keinen Einfluss auf die durch das Proteasom vermittelte ODD-SBFP2 Degradation hatte.

5. Diskussion

5.1. Etablierung einer A3G/Vif doppelstabilen Zelllinien als Testsystem für die Identifizierung von neuartigen A3G-Abbauinhibitoren

Im Jahr 2002 wurde mit der zellulären Cytidineaminase A3G erstmals ein zellulärer Faktor zur Abwehr von HIV identifiziert (Sheehy et al., 2002). Weiterführende Untersuchungen führten zur Offenlegung des antiviralen Wirkmechanismus von A3G, der in der Hauptsache auf einer Hypermutation des HIV-Genoms beruht (Harris et al., 2003). Durch die Expression des akzessorischen Proteins Vif ist das HI-Virus in der Lage der durch A3G vermittelten antiviralen Restriktion zu entgehen. Vif bindet dabei spezifisch an A3G und induziert dessen proteasomalen Abbau (Albin und Harris, 2010). Durch Versuche mit interaktionsdefizienten Vif als auch A3G-Mutanten konnte verdeutlicht werden, dass eine Inhibition der Interaktion den proteasomalen Abbau von A3G blockiert und damit zum Erhalt dessen antiviraler Aktivität führt. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde der Vif-A3G-Interaktion und dem damit einhergehenden induzierten A3G-Abbau eine zukünftige Rolle als therapeutisches Ziel bei der Behandlung von HIV-Infektionen attestiert.

Zur Identifizierung von spezifischen Inhibitoren des Vif induzierten A3G-Abbaus wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene zelluläre Testsysteme etabliert. Basis eines dieser Testsysteme ist eine Zelllinie, die sowohl ein N-terminal mit EYFP markiertes A3G Protein als auch ein unter der Kontrolle des Tet-Off-Expressionssystem stehendes Vif stabil exprimiert. In Gegenwart von Vif erfolgt der rasche Abbau des EYFP-A3G Fusionsproteins und damit verbunden ein Rückgang der EYFP-Reporterfluoreszenz in den Zellen. Eine Blockierung des A3G-Abbaus, hervorgerufen durch beispielsweise eine niedermolekulare Verbindung, sollte zu einer Erhöhung des Reporterfluoreszenzsignals führen.

Vor der Herstellung der doppelstabilen Zelllinie wurden zunächst alle dafür benötigten Komponenten eingehend auf ihre Funktionalität hin untersucht. Im Zentrum der Untersuchungen stand das EYFP-A3G Fusionskonstrukt. Wie die Ergebnisse zeigten, hatte die die Fusion mit EYFP keinen Einfluss auf die wildtypische Funktion von A3G. So erfolgte bei Ko-Expression von wildtypischen Vif der rasche Abbau von EYFP-A3G. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von EYFP-A3G exprimierenden HEK293T-Zellen offenbarten außerdem die für A3G charakteristische cytoplasmatische Lokalisation des Fusionskonstrukts (Muckenfuss et al., 2006; Wichroski et al., 2006). Daneben konnten das Auftreten von stark fluoreszierenden diskreten cytoplasmatisch lokalisierten Foci beobachtet

werden, bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um sogenannte *P-bodies* handelt. Anderswo konnte bereits gezeigt werden, dass A3G zusammen mit zellulären RNAs und Proteinfaktoren in *P-bodies* akkumuliert (Wichroski et al., 2006, Gallois-Montbrun et al., 2007). *P-bodies* spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Prozessierung von nicht-translatierenden mRNAs (Parker und Sheth, 2007). Es konnte weiterhin demonstriert werden, dass EYFP-A3G, wie bereits für wildtypisches A3G beschrieben (Alce und Popik, 2004; Cen et al., 2004; Burnett und Spearman, 2007) spezifisch in Viruspartikel inkorporiert wird und die Partikelinfektiosität effektiv vermindert. Es ließ sich zeigen, dass an der Reduktion der Partikelinfektiosität Deaminase-abhängige Mechanismen beteiligt waren. Sequenzanalysen des integrierten EGFP-Reportergens ergaben ein für A3G spezifisches G zu A Mutationsprofil, welches eine hohe Übereinstimmung mit bereits publizierten Sequenzanalysen aufweist (Harris et al., 2003; Liddament et al., 2004; Haché et al., 2005). Hier wurde ebenfalls ein integriertes GFP-Reportergen als Sonde für die mutagene Wirkung von A3G verwendet. Die Auswertung der Sequenzdaten ergab weiterhin, dass kein Unterschied zwischen dem Mutationsmuster für wt A3G und EYFP-A3G besteht.

Die Herstellung der doppelstabilen Zelllinie erfolgte durch Transduktion von HEK293T-Zellen mit dem pTTT-Vif Vektor und anschließender Transfektion mit dem EYFP-A3G Konstrukt. In dieser Reihenfolge in die Zellen eingebracht, kann eine durch A3G vermittelte Editierung der TetOffVif-Expressionskassette gänzlich ausgeschlossen werden. Bis dato konnte noch nicht endgültig geklärt werden, ob A3G auch das Genom von eindringenden viralen Partikeln enzymatisch editiert und auf diesem Wege die Virusvermehrung hemmt.

Die Charakterisierung der Zelllinie ergab, dass auch im Kontext der Zelllinie das EYFP-A3G Konstrukt alle relevanten A3G-typischen Eigenschaften, wie die Degradation bei Ko-Expression von Vif, spezifische Partikelinkorporation, Hemmung der Infektiosität als auch A3G typische subzelluläre Lokalisation aufweist. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass der Abbau des A3G-Fusionskonstruktes in Gegenwart von Vif sehr schnell verläuft und präzise über das An- und Abschalten der Vif-Expression gesteuert werden kann.

Ein unerwartetes Ergebnis der Zellliniencharakterisierung war, dass sowohl für Vif als auch für A3G keine posttranslationale Modifikation in Form einer Ubiquitinierung nachgewiesen werden konnten. Für das Vif-Protein ist bekannt, dass es einem für seine Funktion essentiellen raschem zellulärem Abbau unterliegt. In *Pulse-Chase*-Experimenten konnte für Vif eine Halbwertszeit von ~45 min ermittelt werden (Khamsri et al., 2006; Nathans et al., 2008). Dieser schnelle zelluläre Abbau von Vif wird durch das Ubiquitin-abhängige Proteasom-System kontrolliert (Fujita et al., 2004). Wie bereits in der Einleitung dargelegt,

erfährt auch APOBEC3G in Gegenwart von Vif eine Modifikation durch das kovalente Anheften von Ubiquitinmolekülen. Als eindeutiger Beleg für die Ubiquitinierung eines Zielproteins gilt in der Western Blot Analyse das Auftreten aufeinanderfolgender Banden des Zielproteins, die um je eine Ubiquitinmasse voneinander abweichen (Fujita et al., 2004; Mehle et al., 2004a). Die Anzahl der Banden entspricht dabei der Zahl an angehängten Ubiquitinresten. Wie die Analysen mit einem Ubiquitin spezifischen Antikörper ergaben, konnte ein solches Ubiquitinierungsmuster weder für Vif noch APOBEC3G nachgewiesen werden. Lediglich ein Ubiquitinsignal bei > 200 kDa konnte detektiert werden, was bei Induktion der Vif-Expression deutlich verstärkt war. Dies stellt allerdings noch keinen eindeutigen Beweis für eine Ubiquitinierung von Vif oder A3G dar. Die Unfähigkeit ubiquitiniertes Vif als auch A3G nachweisen zu können, kann damit zusammenhängen, dass nur ein sehr geringer Anteil an Vif und A3G in ubiquitiniertem Zustand in der Zelle vorliegt und die Sensitivität der in dieser Arbeit verwendeten Western-Blot Technik nicht ausreicht, solche geringe Mengen nachzuweisen. Abhilfe könnte hier eine Überexpression von plasmidkodiertem Ubiquitin bringen, wie sie standardmäßig bei Untersuchungen zur Ubiquitinierung von A3G und Vif erfolgt (Yu et al., 2003; Mehle et al., 2004b; Shao et al., 2010; Wang et al., 2011). Dabei gilt allerdings zu beachten, dass die Überexpression von Ubiquitin möglicherweise in artifiziellen Ubiquitinierungsmustern resultiert und damit ein verfälschtes Bild des Ubiquitierungsstatus eines Zielproteins liefert (Hjerpe et al., 2009). Es sollte daher auf Methoden zurückgegriffen werden, die ohne eine Überexpression von Ubiquitin auskommen und sensitiv genug sind, den Ubiquitinierungsstatus eines Zielproteins bei physiologischem Expressionsniveau zu bestimmen.

Der Nachweis, dass der Abbau von EYFP-A3G im Kontext der Zelllinie durch das Ubiquitin-abhängigen Proteasomsystem vermittelt wird, konnte durch die Verwendung der Inhibitoren MG132 und PYR41 erbracht werden. Bei MG132 handelt es sich um einen Peptidinhistor der die Chymotrypsinaktivität des Proteasoms hemmt und im Rahmen von Studien zum proteasomalen A3G-Abbau routinemäßig zur Blockierung des Proteasoms eingesetzt wird (Marin et al., 2003; Sheehy et al., 2003; Liu et al., 2004; Li et al., 2008). Der Inhibitor PYR41 hingegen, wirkt direkt auf die E1-Ligase und hemmt die Aktivierung von Ubiquitin (Yang et al., 2007). Als weitere Aktivität von PYR41 wird die Inhibition von bestimmten Deubiquitinasen als auch ein *cross-linking* verschiedener Proteinkinasen beschrieben (Kapuria et al., 2011). In Übereinstimmung mit der Literatur ergab die Behandlung mit MG132 eine Hemmung der Degradation von EYFP-A3G. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine inhibitorische Wirkung von PYR41 auf den

Abbau von A3G nachgewiesen werden. Völlig unerwartet führte die Behandlung der Zellen mit PYR41 zu einer deutlichen Anreicherung von stark fluoreszierenden cytoplasmatischen Komplexen. Möglicherweise bewirkt eine durch PYR41 vermittelte Blockierung der Ubiquitinierung in Gegenwart von Vif die Transition von A3G in hochmolekulare Proteinkomplexe. Ergebnisse von Goila-Gaur et al. lassen vermuten, dass Vif in einem vom proteasomalem Abbau unabhängigen Prozess A3G in hochmolekulare Proteinkomplexe dirigiert und so dessen Verpackung in Viruspartikel unterbindet (Goila-Gaur et al., 2008). Zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus von PYR41 im Zusammenhang mit dem A3G Abbau sind weitere Analysen erforderlich.

Als letzter Punkt der Charakterisierung der Zelllinie erfolgte die Bestimmung des Z-Faktors. Dies ist ein dimensionsloser statistischer Parameter, der einen ersten wichtigen Hinweis zum Potential eines Screeningsystems für die Wirkstoffsuche im Hochdurchsatzverfahren gibt (Zhang et al., 1999). Der klare Vorteil des Z-Faktors gegenüber anderen Testsystemkennzahlen wie dem Signal-zu-Rausch Verhältnis (S/N) oder dem Signal-zu-Hintergrund Verhältnis (S/B) besteht darin, dass sowohl der dynamische Messbereich als auch die Messwertvarianz mit in seine Berechnung einfließen. Für die 293T^{Vif TetOff/EYFP-A3G} Zelllinie konnte ein Z-Wert von 0,67 ermittelt werden. Es handelt sich damit beim A3G-Abbauassay um ein exzellentes Testsystem für die Substanzsuche im Hochdurchsatzverfahren (Zhang et al., 1999).

Neben einem optimalen Z-Faktor machen noch weitere Eigenschaften diesen Assay für die Substanzsuche wertvoll. Der A3G-Abbauassay weist als zellulärer Assay gegenüber zellfreien Testsystemen den entscheidenden Vorteil auf, dass nur membrangängige Substanzen von diesem erfasst werden. Dies ist insofern erwünscht, als das der Vif-induzierte A3G-Abbau ein intrazellulär ablaufender Prozess ist. Überdies lässt sich mit einem zellulären Assay schon zu einem frühen Zeitpunkt der Wirkstoffsuche feststellen, ob eine Testsubstanz cytotoxische Eigenschaften besitzt, was in der Regel ein Ausschlusskriterium für die Weiterentwicklung eines Wirkstoffes darstellt.

Der vorgestellte A3G-Abbauassay stellt eine Erweiterung von bereits existierenden Testsystemen dar. Im Zusammenhang mit dem proteasomalen Abbau von A3G sind bis jetzt drei fluoreszenzbasierte zelluläre Testsysteme beschrieben worden (Conticello et al, 2003; Nathans et al, 2008; Cen et al., 2010). Bei diesen Systemen handelte es sich im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit entwickelten A3G-Abbauassay um transiente Testsysteme, was bedeutet, dass vor jedem neuen Versuchslauf die Testkomponenten, im Einzelnen die Gene für Vif und markiertes A3G, mittels transienter Transfektion in Zellen eingebracht werden müssen. Dieses

Einbringen ist meist mit einer durch das Transfektionsreagenz bedingten Zellschädigung verbunden, was die Anwendbarkeit eines solchen Testsystems für das Substanzscreening im Hochdurchsatzverfahren einschränkt. Transiente Testsysteme sind darüber hinaus oftmals durch eine geringe Reproduzierbarkeit gekennzeichnet und eine Kontrolle der Transgenexpression ist nur bedingt möglich. All dieser Nachteile bestehen mit dem zelllinienbasierten A3G-Abbauassay nicht.

Die Nutzbarkeit des Assays für die Substanzsuche beschränkt sich bis dato auf das 96-Well Plattenformat, was für ein automatisiertes Hochdurchsatzscreening noch nicht ausreichend ist. Als nächster Schritt sollte daher eine weitere Miniaturisierung des Assays erfolgen.

5.2. Etablierung von Kontrollassays zur Detektion falsch positiv wirkender Substanzen

Ein grundlegendes Problem bei der Wirkstoffsuche im Hochdurchsatzverfahren besteht im Auftreten von falsch-positiven Treffern. Diese sind in der Regel durch Substanzen bedingt, die durch einen nicht das Target betreffenden Mechanismus die Funktion des eingesetzten Screeningsystems beeinflussen und so ein falsch-positives Signal generieren. Fallweise und in Abhängigkeit vom verwendeten Testsystem können falsch-positive Treffer bis zu 95 % der im initialen Screening als aktiv identifizierten Substanzen ausmachen (Thorne et al., 2010). Ursächliche Gründe für falsch-positive Hits sind beispielsweise die Eigenfluoreszenz von Testsubstanzen, Substanzaggregation, eine substanzvermittelte Störung der Reporterfunktion, Zytotoxizität oder die kovalente Reaktivität einer Testsubstanz (Thorne et al. 2010). Bei der Verwendung von fluoreszenzbasierten Screeningsystemen für die Wirkstoffsuche ist besonders die Eigenfluoreszenz von Testsubstanzen von großer Relevanz, da diese unter Umständen ein positives Ergebnis vortäuschen als auch ein echt-positives Ergebnis überlagern kann.

Auch bei der Wirkstoffsuche mit dem in dieser Arbeit etablierten A3G-Abbauassay sind falsch positive Ergebnisse zu erwarten. Neben den bereits erwähnten allgemeinen Störfaktoren können für den A3G-Abbauassay weitere assay-spezifische Gründe für falsch-positive Ergebnisse benannt werden. So ist es denkbar, dass durch eine Störung des Tet-Off-Expressionssystems mit einhergehender Hemmung der Vif-Expression ein falsch-positives Ergebnis, angezeigt durch ein erhöhtes EYFP-A3G Signal, generiert wird. Ein ebenfalls scheinbar positives Ergebnis kann von Substanzen ausgehen, die mit dem Proteasom selbst oder der Ubiquitinierungsmaschinerie interferieren und so den A3G Abbau hemmen. Zum

Ausschluss falsch-positiver Treffer wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Zelllinienbasierte Assays als Kontrollsysteme etabliert.

Die HeLa^{DsREDmonomrerTetOff}-Zelllinie findet Anwendung als Testsystem zum Auffinden von Substanzen, die störend auf die Tet-Off kontrollierte Transgenexpression wirken. Die 293T^{ODD-SBFP2} Zelllinie hingegen erfasst Inhibitoren des Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Proteinabbaus. Der proteasomale Abbau des ODD-SBFP2-Fusionskonstruktes weist starke Parallelen zum Vif induzierten Abbau von A3G auf, in dem das ODD-Reporterkonstrukt durch das Adaptorprotein VHL über eine BC-Box vermittelte Interaktion mit ElonginC an einen E3 Ligasekomplex gekoppelt wird, der die Ubiquitinierung des ODD-Reporterkonstrukt bewirkt und es damit an das Proteasom adressiert. Wie die Charakterisierung der Zelllinie ergab, besteht mit der 293T^{ODD-SBFP2} Zelllinie ein sehr sensitives und spezifisches Testsystem für den Nachweis von Inhibitoren des proteasomalen Proteinabbaus. So zeigten schon Mengen des Proteasominhibitors MG132 im Nanomolbereich einen deutlichen Effekt auf die Expression des ODD-SBFP2 Konstruktes. Auch die Behandlung mit dem E1-Ligase Inhibitor PYR41 resultierte in einer Erhöhung des ODD-SBFP2 Expressionsniveaus, was ein sicherer Beweis für die Ubiquitin-Abhängigkeit des Abbaus des Reporterkonstrukts ist. Wie auch die HeLa^{DsREDmonomrerTetOff} Zelllinie erreichte die 293T^{ODD-SBFP2} Zelllinie einen optimalen Z-Faktor. Wie schon für den A3G-Abbauassay erwähnt, muss für eine wirtschaftliche Nutzung beider Kontrollassays noch eine Miniaturisierung erfolgen. Abseits der Verwendung als Kontrollassays zum Ausschluss falsch positiver Wirkstoffe im Zusammenhang mit dem A3G-Abbau, bietet sich die 293T^{ODD-SBFP2} Zelllinie auch für die Identifizierung neuartiger Proteasominhibitoren an.

Aufgrund der Verwendung von fluoreszierenden Proteinen mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften als Reporter war es möglich, alle drei Zelllinien zu einem multifluoreszenten Testsystem zu kombinieren. Ein solches System sollte die präzise Identifizierung von spezifischen Abbauinhibitoren in einem Screeninglauf ermöglichen und damit den Zeit- als auch Kostenaufwand bei der Suche nach neuen Wirkstoffen reduzieren. Eine Pilotstudie mit den Substanzen RN-18, MG132 und PYR41 ergab, dass die Kultivierung aller drei zelllinienbasierter Testsysteme keinen wesentlichen Einfluss auf deren individuelle Leistungseigenschaften hatte. Eine Adaptierung des multifluoreszenten Testsystems an das 96-Well Format war noch nicht erfolgreich, weshalb zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Aussage über die Brauchbarkeit dieses Assays für die Substanzsuche im Hochdurchsatzformat getroffen werden kann.

5.3. Etablierung eines auf der BiFC-Technik basierenden Systems zur Identifizierung von Inhibitoren der Vif-ElonginC-Interaktion

Die Attraktivität der Vif-ElonginC-Interaktion als primäre Zielstruktur für neue antiretrovirale Therapeutika speist sich aus der Kenntnis, dass die direkte Interaktion zwischen Vif und ElonginC eine unabdingbare Voraussetzung für den Abbau von A3G darstellt, in dem A3G durch Vif über eine durch die BC-Box vermittelte Wechselwirkung mit ElonginC an einen E3-Ligase Komplex gekoppelt wird, der seinerseits die Polyubiquitinierung von A3G katalysiert und damit dessen proteasomalen Abbau einleitet. Zum anderen ist der Vif-ElonginC - Interaktionskomplex der bis dato einzige Komplex in der A3G-Abbausequenz, zu dem verlässliche Daten der dreidimensionalen Struktur verfügbar sind und damit ein zielgerichtetes Design von Interaktionsinhibitoren möglich ist (Stanley et al., 2008). An dieser Stelle sei vermerkt, dass die von Stanley et al. aufgelöste Kristallstruktur ElonginC im Komplex mit einem die BC-Box umfassenden C-terminalen Fragment von Vif und nicht mit dem Volllängenprotein zeigt (siehe Abb. 5.1 auf der nächsten Seite).

Die Vif-ElonginC-Interaktion gewinnt weiter an Attraktivität als therapeutisches Ziel durch die Tatsache, dass nicht nur der Abbau von A3G, sondern auch der von A3C, A3DE und A3F durch Vif gesteuert wird, wobei auch hier die BC-Box vermittelte Wechselwirkung von Vif mit ElonginC essentiell für den proteasomalen Abbau der genannten Deaminasen ist. Ein Blockieren der Vif-ElonginC-Interaktion hätte folglich die Hemmung des proteasomalen Abbaus aller vier A3 Proteine zum Resultat. Gegenüber einer Hemmung der direkten Interaktion zwischen Vif und den A3-Proteinen weist eine Inhibition der Vif-ElonginC-Interaktion den klaren Vorteil auf, dass theoretisch ein Wirkstoff ausreicht, um den durch das Proteasom vermittelten Abbau von A3C, A3DE, A3G und A3F zu unterbinden. Diese Behauptung gründet auf der Tatsache, dass die direkte Interaktion der aufgeführten A3-Proteine mit Vif durch verschiedene, sich teilweise überlappende konservierte Proteinbereiche auf dem Vif-Protein vermittelt wird (He et al., 2008; Zhang et al., 2008; Kitamura et al., 2011).

Das antivirale Potential einer Inhibition der Vif-ElonginC-Interaktion durch niedermolekulare Verbindungen konnte durch eine erst kürzlich veröffentlichte Studie demonstriert werden. Hier wurde mit der Substanz VEC-5 ein Wirkstoff entwickelt, der spezifisch die BC-Box vermittelte Interaktion von Vif mit ElonginC hemmt und damit einhergehend den Abbau von A3C, A3G und A3F inhibiert (Zuo et al., 2012).

Zur Identifizierung von weiteren neuen Inhibitoren der Vif-ElonginC-Interaktion wurde in der vorliegenden Arbeit ein auf der BiFC-Technik basierendes Testsystem entwickelt, welches die direkte Interaktion zwischen einem die BC-Box umfassenden C-terminalen Vif-Fragment und humanen ElonginC in lebenden Zellen erfasst. Die Verwendung eines Vif-Fragmentes anstelle des Volllängen Vif-Proteins ist dadurch begründet, dass mit vollständigem Vif bis zum jetzigen Zeitpunkt kein funktionierendes BiFC-System etabliert werden konnte. Im Gegensatz zum A3G-Abbauassays bietet das BiFC-System den Vorteil, dass es die direkte Interaktion zwischen zwei Proteinen misst und nicht, wie der A3G-Abbauassay, nur die Degradation von A3G als Endresultat einer Reihe von vorangegangenen Wechselwirkungen, was eine genaue Aussage über den molekularen Wirkungsort eines Inhibitors nicht zulässt.

Eine Evaluierung des BiFC-Assays, durchgeführt mit den bereits charakterisierten Vif BC-box Mutanten L145A, A149L und A149C (Yu et al., 2004) als auch der ElonginC Doppelmutante L100S/103S (Yu et al., 2004) konnten die Spezifität des BiFC-Assays bei der Messung der Interaktion zwischen dem die BC-Box umfassende Vif-Fragment und ElonginC zeigen. So kam es im Falle der interaktionsdefizienten Vif BC-Box Mutanten L145A und A149L sowie der interaktionsdefizienten ElonginC Doppelmutante L100S/103S zu einer verminderten Bildung von BiFC- Komplexen. Die interaktionskompetente Vif BC-Box Mutante A149C hingegen war in ihrer Fähigkeit einen BiFC-Komplex mit ElonginC auszubilden nicht beeinträchtigt. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit mittels des BiFC-Assays erstmalig gezeigt werden, dass auch das Valin an Position 142 im Vif-Protein an der Interaktion der BC-Box mit ElonginC beteiligt ist. Ein Austausch von Valin gegen Glycin an dieser Position führte zu einer signifikanten Beeinträchtigung der BiFC-Komplexbildung. Ausgehend von den durch Stanley et al. 2008 publizierten Daten war dieses Ergebnis vermutet worden (siehe Abb. 5.1).

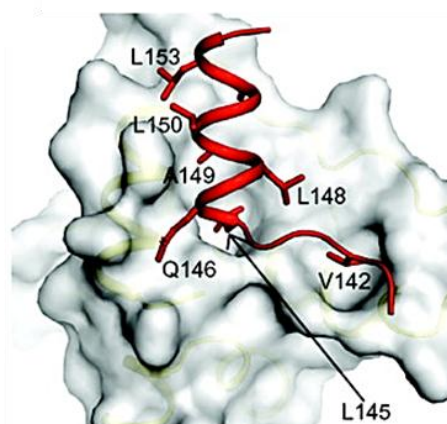


Abbildung 5.1: Räumliche Teildarstellung eines aus ElonginC (grau) und der Vif BC-Box (rot) bestehenden Interaktionskomplexes. Aus Stanley et al., 2008.

Wie aus Abbildung 5.1 hervorgeht, lagert sich neben der Aminosäure Leucin an Position 145 auch Valin (V142) tief in eine Bindetasche auf dem ElonginC-Protein ein und trägt damit zur Interaktion von Vif mit ElonginC bei. Durch weiterführende Analysen muss noch geklärt werden, ob sich die mit dem BiFC-Assay ermittelten Daten auch auf das Volllängen Vif-Protein übertragen lassen.

In der vorliegenden Arbeit erzielte der BiFC-Assay im Gegensatz zu den anderen etablierten zellulären Testsystemen einen suboptimalen Z-Wert von 0,35, was dessen Einsatzbarkeit für die Substanzsuche im Hochdurchsatzverfahren stark einschränkt. Eine Verbesserung des BiFC-Assay mit Hinblick auf die Substanzsuche im HTS-Format ist daher unerlässlich. Eine Möglichkeit der Verbesserung besteht in der Generierung einer Zelllinie, die die BiFC-Konstrukte stabil ko-exprimiert. Die Expression der BiFC-Konstrukte sollte dabei unter die Kontrolle des Tet-Off Expressionssystems gestellt werden. Dies würde zu einer besseren Handhabbarkeit der Zelllinie beim Substanzscreening führen, in dem die Expression der BiFC-Konstrukte auf den Zeitpunkt der Substanztestung begrenzt werden kann.

Im Rahmen von Kompetitionsexperimenten wurde die Funktionalität der BiFC-Konstrukte CV-Vif 192 (wt) und CV-Vif192 (L145A) eingehender analysiert. Wie sich zeigte, resultierte aus der Ko-Expression des wildtypischen Vif-BiFC-Konstrukt eine Hemmung des Vif induzierten Abbaus von EYFP-A3G, wohingegen die Ko-Expression des interaktionsdefizienten BiFC-Konstrukts CV-Vif192 (L145A) keinerlei Wirkung auf die A3G-Degradation hatte. Die weitere Auswertung der Analyseergebnisse ergab, dass die inhibitorische Wirkung des Vif-Fragmentes auf den A3G-Abbau durch die Inhibition der Expression des Volllängen Vif-Proteins bedingt ist. Die Ko-Expression von CV-Vif 192 (wt) führte zu einer Inhibition der Expression des Volllängen Vif-Proteins, was bei Ko-Expression des BiFC-Konstrukts CV-Vif192 (L145A) nicht beobachtet werden konnte. Es kann vermutet werden, dass das Vif-Fragment die Interaktion von Vif mit ElonginC stört und damit verbunden die Destabilisierung von Vif durch einen noch unbekanntem Mechanismus bewirkt.

Ein vergleichbarer Effekt konnte durch eine Substitution von Leucin durch Alanin an Position 145 im Volllängen Vif-Protein erreicht werden. Im vorliegenden Fall war das Expressionsniveau der L145A-Mutante im Vergleich zum nicht-mutierten Vif-Protein um ein Vielfaches niedriger. Die hier durch die Mutation der BC-Box verursachte Reduktion des Vif-Expressionsniveaus konnte auch in zwei weiteren Forschungsarbeiten beobachtet werden (DeHart et al., 2008; La Rue et al., 2010). Der Frage nach dem Mechanismus, der diesem Effekt zugrunde liegt, wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht weiter nachgegangen. Ergebnisse für andere BC-Box Proteine legen den Schluss nahe, dass es sich bei dem für Vif beobachteten

Effekt um kein Artefakt handelt. So konnte für die BC-Box Proteine, VHL (Schoenfeld et al., 2000; Kamura et al. 2002), NS1 aus RSV (Straub et al., 2011) und BAF250 (Li et al., 2010) demonstriert werden, dass eine mit der Modifizierung der BC-Box verbundene Inhibition der Interaktion mit ElonginC zu einem beschleunigten zellulären Abbau der BC-Box Proteine führt. Im Fall von NS1 wird angenommen, dass der beschleunigte Abbau durch das Lysosom vermittelt wird. Bei VHL und BAF250 konnte gezeigt werden, dass diese Proteine im E3-Ligase Komplex vor einer Degradation durch das zelluläre Proteasom geschützt sind. Für die Vif BC-Box Mutanten kann ebenfalls ein proteasomaler Abbau angenommen werden, da es in Folge der Hemmung des Proteasoms durch MG132 zu einer signifikanten Erhöhung des Expressionsniveaus der Mutante kam.

Unter Einbeziehung der vorhandenen Literaturdaten legen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse den Schluss nahe, dass die Interaktion von Vif mit Bestandteilen des E3-Ligase Komplexes dessen Stabilisierung innerhalb der Zelle bewirkt. An dieser Stelle darf nicht unerwähnt bleiben, dass der unlängst publizierte Vif-ElonginC-Interaktionsinhibitor VEC-5 keinen negativen Effekt auf die Stabilität von Vif zeigt, obschon er spezifisch auf die BC-Box Bindestelle auf dem ElonginC-Protein abzielt und so eine Interaktion mit Vif effektiv unterbindet (Zuo et al., 2012). Zur Klärung dieser gegensätzlichen Befunde bedarf es weitere Untersuchungen. Zukünftige Studien sollten unter anderem dahingehend unternommen werden, denjenigen Faktor zu identifizieren, der den rapiden Abbau von Vif, welches nicht mit dem E3-Ligase Komplex assoziiert ist, vermittelt. Ein möglicher Kandidat stellt dabei der zelluläre Faktor MDM2 dar. Wie Izumi et al. belegen konnte, bindet MDM2 an eine N-Terminal gelegene Aminosäureregion im Vif Protein und veranlasst dessen Polyubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom (Izumi et al., 2009).

5.4. Analyse von RN-18 Derivaten

Ein weiterer Schwerpunkt dieses Projektes umfasste die Analyse von Derivaten des A3G-Abbau Inhibitors RN-18. Unter den Derivaten befand sich mit FM85 nur eine Verbindung, die eine höhere Hemmwirkung auf den Vif induzierten A3G-Abbau zeigte als RN-18. Dieses positive Ergebnis relativierte sich allerdings bei Auswertung der mit der DsRED-Kontrollzelllinie generierten Daten. Diese ergaben eine nahezu totale Hemmung der TetOff kontrollierten DsRED Expression durch FM85. Angesichts dieser Daten ist davon auszugehen, dass FM85 durch eine Inhibition der TetOff kontrollierten Vif-Expression den Anstieg des EYFP-A3G Signals verursacht und damit ein falsch positives Ergebnis generiert. Gleiches gilt

für die weiteren, mit der doppelstabilen Zelllinie als positiv getesteten, Derivate. Ein unerwartetes Ergebnis erbrachte die Analyse des als Kontrolle mitgeführten RN-18. Auch in diesem Fall konnte eine deutliche Hemmung der TetOff regulierten Transgenexpression nachgewiesen werden. Weiterhin konnte für RN-18 bei einer Konzentration von 30 μM ein deutlich negativer Einfluss auf die Zellvitalität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den bereits an anderer Stelle für RN-18 publizierten Daten zur Toxizität. Die Gruppe um Tariq M. Rana konnte keinerlei von RN-18 ausgehende Toxizität bei Mengen bis zu 100 μM sowohl bei HeLa als auch H9-Zellen nachweisen (Nathans et al., 2008; Ali et al. 2012). Da ebenfalls, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, die Toxizität mittels MTT-Assay bestimmt wurde, können Assay-spezifische Gründe für die konträren Befunde weitestgehend ausgeschlossen werden. Eine Qualitätskontrolle der in dieser Arbeit genutzten RN-18 Präparation mittels NMR durch die Arbeitsgruppe Schirmeister ergab keine Hinweise auf Verunreinigungen, die eine Beeinflussung der Zellvitalität hätten herbeiführen können. Bezüglich des Wirkmechanismus von RN-18 ist lediglich bekannt, dass RN-18 in Gegenwart von A3G die Expression von Vif herunterreguliert und damit zum Erhalt des antiviralen Potentials von A3G führt (Nathans et al., 2008). Es wurde die Vermutung geäußert, dass RN-18 die Polyubiquitinierung von A3G durch einen noch unbekanntem Mechanismus blockiert und gleichzeitig die Ubiquitinierung von Vif verstärkt, was letztendlich in einer Proteasom vermittelten Destabilisierung von Vif resultiert (Zuo et al., 2012). Bis jetzt konnte die molekulare Zielstruktur von RN-18 nicht identifiziert werden. Vor diesem Hintergrund können sogenannte *off-target* Effekte des Inhibitors nicht ausgeschlossen werden. Es besteht die Möglichkeit, dass genannte Effekte in einem besonderen Maße bei Messungen mit den hier etablierten TetOff basierten zellulären Screeningsystemen zum Tragen kommen und damit die vermeintlich spezifische Aktivität von RN-18 überdecken. Dies würde allerdings bedeuten, dass die Screeningsysteme gerade für die Analyse von RN-18 und diesem strukturverwandten Wirkstoffen unzureichend sind. Andererseits demonstrieren die Ergebnisse eindrucksvoll den Nutzen von Kontrollsystemen bei der Suche nach neuen Wirkstoffen. Weitere Hinweise auf eine *off-target* Aktivität von RN-18 erbrachten Studien, die in unserer Gruppe durchgeführt wurden. Hier konnte im Rahmen der Etablierung eines HIV-1 Replikationsassay festgestellt werden, dass RN-18 die Generierung von VSV-G pseudotypisierten Reportergenviren auch in Abwesenheit von Vif und A3G beeinträchtigt (Otto, 2010).

Weiterführende Studien zum Inhibitor RN-18 sollten die Identifizierung seines molekularen Targets zum Schwerpunkt haben.

5.5. Analyse von Inhibitoren der Vif- ElonginC-Interaktion

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Analyse von potentiellen Inhibitoren der Vif-ElonginC-Interaktion. Die strukturellen Gegebenheiten des Vif-ElonginC-Interaktionskomplexes begünstigen das Design von Substanzen, die sich in die hydrophobe BC-Box Bindetasche auf dem ElonginC-Protein einlagern und so potentiell die Interaktion mit Vif blockieren. Die Strategie, Wirkstoffe zu entwickeln, die sich gegen invariable zelluläre Proteine wie ElonginC und nicht gegen hochvariable Virusproteine wie Vif richten, birgt den Vorteil, dass die Entwicklung einer Wirkstoffresistenz aufgrund einer Mutation der Zielstruktur wenig wahrscheinlich ist.

Insgesamt 42 Interaktionsinhibitoren ließen sich durch chemische Synthese herstellen. Zur Überprüfung ihrer inhibitorischen Wirkung auf den Vif induzierten Abbau von A3G wurden die Substanzen in einem initialen Screening mittels des A3G-Abbauassays getestet. Insgesamt drei Substanzen führten zu einer mindestens 50%igen Hemmung des Abbaus von EYFP-APOBEC3G und waren gleichzeitig nur sehr schwach toxisch. Es konnte weiter gezeigt werden, dass bis auf A19 die beiden anderen Substanzen, A15 und FM173, die TetOff regulierte DsREDmonomer Expression deutlich inhibierten, bei FM173 bis zu 80%. Damit ist davon auszugehen, dass die inhibitorische Wirkung von A15 und FM173 im Zusammenhang mit der Degradation von EYFP-A3G auf eine Hemmung der Tet-Off kontrollierten Vif Expression zurückzuführen ist. Aus noch nicht geklärten Gründen war das im Hinblick auf die Inhibition des A3G-Abbaus positive Ergebnis für A19 bislang nicht reproduzierbar.

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit keine neuen Vif-ElonginC-Interaktionsinhibitoren identifiziert werden konnten, sollte an deren Entwicklung festgehalten werden. Es ist zu vermuten, dass derartige Wirkstoffe neben der Vif-ElonginC-Interaktion das Potenzial haben, weitere durch virale BC-Box Proteine vermittelte Interaktionen mit ElonginC zu inhibieren. Neben Vif induzieren noch die viralen BC-Box Proteine NS1 aus dem humane respiratorische Synzytialvirus (HRSV) (Elliot et al., 2007) und das adenovirale Protein E4orf6 (Luo et al., 2007) den Proteasom vermittelten Abbau von zellulären Faktoren, die nachteilig für die Vermehrung des jeweiligen Virus sind. Ähnlich wie im Fall von Vif koppeln diese dabei den für sie entsprechenden zellulären Faktor über eine BC-Box vermittelte Interaktion mit ElonginC an einen E3-Ligase Komplex, mit anschließender Ubiquitinierung und proteasomaler Degradation. Das vom humane respiratorische Synzytialvirus (RSV) kodierte Nichtstrukturprotein NS1 beispielsweise induziert den proteasomalen Abbau von STAT2

(*Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Elliot et al., 2007) während E4orf6 die Degradation des Tumorsuppressorproteins p53 vermittelt.

Bei einer möglichen Nutzung von ElonginC/BC-Box-Interaktionsinhibitoren als antivirale Therapeutika darf nicht außer Acht gelassen werden, dass ebenfalls eine Vielzahl von zellulären BC-Box Proteinen wie ElonginA (Yasukawa et al., 2008), SOCS1-4 (Okumura et al., 2012), VHL (Kibel et al., 1995) und BAF250b (Li et al., 2010) über die Bildung eines Ubiquitin E3-Ligase Komplexes den proteasomalen Abbau von Proteinfaktoren kontrollieren. Als prominentes Beispiel sei hier das VHL-Protein angeführt, dass die Ubiquitin-abhängige proteasomale Inaktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) kontrolliert und damit eine zentrale Stellung bei der Regulation der Sauerstoffhomöostase einnimmt. Es ist somit damit zu rechnen, dass ElonginC/BC-Box-Interaktionsinhibitoren durch Hemmung der Funktion von zellulären BC-Box Proteinen Nebenwirkung herbeiführen.

5.6. Schlussbemerkung und Ausblick

Mit denen in dieser Arbeit etablierten zellulären Testsystemen sollte es gelingen neue Wirkstoffe zu identifizieren, die unter anderem dazu beitragen können, die Hemmung des Vif induzierten A3G-Abbaus als therapeutisches Ziel weitergehend zu validieren. Bis dato konnte der therapeutische Nutzen einer Inhibition des Vif induzierten A3G-Abbaus noch nicht zweifelsfrei dargelegt werden. Bislang sind nur wenige *in vivo* Studien zum Effekt von A3G auf den Verlauf einer Infektion mit dem HI-Virus veröffentlicht worden. Einige dieser Studien konnten belegen, dass A3G den Krankheitsverlauf im Sinne einer Hemmung positiv beeinflusst (Jin et al., 2005; Ulega et al., 2008; Mussil et al., 2011; Kourteva et al., 2012), wohingegen andere keine Korrelation zwischen dem A3G-Expressionsniveau und dem Krankheitsfortschritt feststellen konnten (Cho et al., 2006; Amoêdo et al., 2011). In jüngster Zeit mehren sich die Hinweise, dass die durch A3G katalysierte Editierung des HIV-Genoms nicht in jedem Fall zu Lasten der Virusreplikation geht, sondern gar die Entwicklung von Resistenzen gegenüber antiviraler Therapeutika fördern kann (Monajemi et al., 2012). Konkret konnten Sadler et al. in Replikationsexperimenten bei Anwesenheit physiologischer A3G-Mengen HI-Viren mit subletal editiertem Genom nachweisen (Sadler et al., 2010). In einer anderen Studie konnte experimentell belegt werden, dass A3G die Entwicklung einer Resistenz gegenüber dem Nukleosid-Analoga RT Inhibitor 3TC begünstigt (Kim et al., 2010). Gegen die dienliche Rolle von A3G bei der Virusvermehrung als auch der Resistenzentwicklung steht eine erst kürzlich veröffentlichte Studie, die die A3G induzierte Hypermuation als ein „Alles

oder Nichts Phänomen“ beschreibt (Armitage et al., 2012). Mit anderen Worten kommt es in Anwesenheit von A3G in jedem Fall zu einer Hypermutation und damit verbunden zu einer letalen Schädigung des Virus.

Die im Rahmen des Wettbewerbsversuches mit dem Vif-Fragment gemachte Beobachtung zur Destabilisierung von Vif veranlassen zu der Überlegung, parallel zur Identifizierung und dem Design niedermolekularer ElonginC-Vif-Interaktionsinhibitoren einen Peptidinhibitor auf Basis des in dieser Arbeit vorgestellten C-terminalen Vif-Fragmentes zu entwickeln. Ein solcher Inhibitor hätte nicht nur das Potenzial, die Komplexbildung von Vif mit dem E3-Ligase Komplex und damit verbunden den Abbau von A3G als auch von A3C, A3DE, A3F zu verhindern, sondern zudem auch eine Herunterregulation von Vif zu bewirken. Wie eingangs erwähnt, nimmt Vif auch unabhängig von der A3G Restriktion durch unterschiedliche Mechanismen Einfluss auf die Replikation von HIV-1. Die Verwendung von Peptid-basierten Inhibitoren wird allerdings durch eine Reihe von Nachteilen limitiert. So sind Peptidinhibitoren unter anderem oft durch eine geringe metabolische Stabilität als auch durch eine schlechte Membrangängigkeit gekennzeichnet (Vlieghe et al. 2010; Pernot et al., 2011). Gerade letzter Punkt ist bei der Anwendung des Vif-Peptides als Inhibitor der Vif-ElonginC-Interaktion von entscheidender Bedeutung, da der Vif induzierte Abbau von A3G innerhalb der Zelle stattfindet. Ein möglicher Lösungsansatz dieses Problems besteht in der Konjugation therapeutisch-aktiver Peptide mit sogenannten *cell-penetrating peptides* (CPPs), die einen effizienten Transport in das Zellinnere vermitteln (Foged du Nielsen, 2008).

Alternativ kann hier auch ein gentherapeutischer Ansatz zur Nutzung des Vif-Fragmentes für die antivirale Therapie in Betracht gezogen werden. Das Potential des Vif-Proteins für die gentherapeutische Behandlung von HIV-Infektionen konnte bereits durch drei Studien gezeigt werden (Vallanti et al., 2005; Porcellini et al., 2009, 2010). Diese thematisieren die Verwendung der Vif-Mutante F12 (F12-Vif) zur A3G-unabhängigen Inhibition der HIV-Replikation. Bei F12-Vif handelt es sich um eine natürliche Vif-Mutante, die durch 14 Aminosäure Substitutionen, von denen 6 die Cul5-Interaktionsdomäne betreffen, gekennzeichnet ist. Weitere Therapiestrategien im Zusammenhang mit dem Vif induzierten A3G-Abbau verfolgen die Erhöhung der A3G-Inkorporation in das Viruspartikel. Ao et al. beispielsweise publizierten ein Fusionsprotein, bestehend aus A3G und einem von HIV-1 Vpr abgeleiteten Polypeptid (R14-88), welches die Virusinkorporation von Vpr vermittelt. Analysen konnten zeigen, dass das A3G-VprR14-88 Fusionskonstrukt weitaus effektiver inkorporiert wird als wildtypisches A3G und damit verbunden zu einer wesentlich stärkeren Inhibition der Virusreplikation führt (Ao et al., 2008, 2011). Vergleichbare Ergebnisse konnten

durch eine Fusion von A3G mit der HIV-1 Nef Mutante Nef7 erzielt werden (Green et al., 2009). Durch die Fusion mit Nef7 konnte die Inkorporationsrate von A3G und damit verbunden die antivirale Aktivität um ein vielfaches gesteigert werden. Gegen die Nutzung, der auf einer exogenen Überexpression von A3G-Fusionskonstrukten basierenden anti-HIV Therapiestrategien, steht eine kürzlich veröffentlichte Studie, die einen Zusammenhang zwischen der Metastasierung des Kolorektalkarzinoms in die Leber und einer durch Überexpression gekennzeichnete Fehlregulation von A3G vermutet (Ding et al., 2011). Vor diesem Hintergrund kann der Vif-basierten Strategie ein großes Potential als neuartige anti-HIV Therapie eingeräumt werden.

6. Zusammenfassung

Als einer der ersten gegen HIV gerichteten Restriktionsfaktoren konnte die Cytidineaminase APOBEC3G isoliert werden. Dieses zelluläre Enzym hemmt äußerst effizient die Replikation von HIV. Weiterführende Untersuchungen konnten demonstrieren, dass die Hemmung der Virusreplikation hauptsächlich auf einer Deaminase-katalysierten G zu A-Hypermethylierung des viralen Genoms während der Reversen Transkription beruht. Als Gegenstrategie zur antiretroviralen Wirkung von A3G kodiert HIV-1 das Protein Vif (*virion infectivity factor*), welches durch eine direkte Wechselwirkung den Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau von A3G bewirkt. Vor diesem Hintergrund wird der Inhibition des Vif induzierten A3G-Abbaus großes Potential als neuartiges Wirkstoffziel bei der Behandlung von HIV Infektionen vorhergesagt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand deshalb in der Etablierung von zellulären Screening-Assays für die Identifizierung von Inhibitoren des Vif induzierten A3G-Abbaus. Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt vier fluoreszenzbasierte zelluläre Assays erfolgreich entwickelt und als Screeningsysteme für die Wirkstoffsuche im Hochdurchsatzverfahren validiert werden. Drei dieser Assays basieren auf stabilen Zelllinien, von denen eine Vif und ein mit EYFP markiertes A3G ko-exprimiert. Dieser sogenannte A3G-Abbauassay stellt den primären Assay für die Identifizierung von Inhibitoren des Vif induzierten A3G-Abbaus dar und wird durch zwei weitere Zelllinien-basierte Assays ergänzt. Diese sekundäre Assays erlauben die Detektion von Substanzen, die falsch-positive oder falsch-negative Signale im A3G-Abbauassays generieren. Zusammengenommen ermöglichen die drei Assays die präzise Identifizierung von Inhibitoren, die spezifisch auf den A3G-Abbau wirken und stellen damit eine wesentliche Verbesserung bereits existierender Screeningsysteme dar. Weiterhin wurde ein auf dem Prinzip der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) basierendes Testsystem entwickelt. Besagtes System misst die direkte Interaktion zwischen Vif und ElonginC in lebenden Zellen und repräsentiert damit ein weiteres Testsystem für die Identifizierung von Inhibitoren der Vif induzierten A3G-Degradation.

Den zweiten Teil dieser Arbeit umfasste die Analyse von Derivaten des Vif Antagonisten RN-18 und neu entwickelten niedermolekularen Inhibitoren der Vif-ElonginC-Interaktion. Als ein wichtiges Ergebnis der Derivat-Analyse ergab sich, dass RN-18 entgegen der veröffentlichten Daten zytotoxisch wirkt und im hier etablierten A3G-Abbauassay ein falsch-positives Signal generiert. Unter den analysierten Vif-ElonginC-Interaktionsinhibitoren

fand sich eine Verbindung, die in einem initialen Screening, unter Verwendung des A3G-Abbauassays, eine deutliche Inhibition der Vif induzierten A3G-Degradation bewirkte.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieses Promotionsprojektes erfolgreich mehrere Screeningsysteme für Identifizierung von spezifischen Inhibitoren des A3G-Abbaus etabliert werden. Diese Systeme werden zukünftig dazu beitragen, das Auffinden von neuartigen Therapeutika für die Behandlung von HIV-Infektionen zu beschleunigen.

7. Summary

One of the first cellular HIV restriction factors isolated was the cytosine deaminase APOBEC3G. This cellular enzyme was shown to effectively inhibit the replication of HIV and other viruses. Further research revealed that repression of the viral replication is primarily based on a deaminase-catalyzed G to A hypermutation of the viral genome during reverse transcription. As a mode of counteraction, the HIV-1 encoded accessory protein Vif (virion infectivity factor) binds to A3G leading to its ubiquitin-dependent proteasomal degradation. It has been hypothesized that inhibition of the A3G degradation rescues the antiviral properties of the APOBEC3 protein and thus represents an attractive target for novel antiretroviral drugs.

Consequently the goal of this study was to establish cellular screening assays for the identification of inhibitors of the Vif induced A3G degradation. Within the scope of this thesis four fluorescent based cellular screening assays have been established and were validated for high-content screening of small organic compounds. Three of these assays are based on stable cell lines, one of which co-expresses Vif and an EYFP tagged A3G protein. This so-called A3G degradation assay represents the primary assay for identification of degradation inhibitors and is complemented by two additional cell line based assays. These secondary assays enable the detection of compounds generating false-positive or false-negative signals in the A3G degradation assay. Together, these systems allow for the precise identification of true-positive A3G degradation inhibitors and thus representing a significant improvement of already existing screening platforms. Furthermore a cellular assay based on the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) was developed. The BiFC-assay measures the direct interaction between Vif and ElonginC in living cells and can be used as a new screening platform for identification of inhibitors targeting the Vif- ElonginC interaction, which is an essential step in the A3G degradation sequence.

The second part the project aimed at the application of the established screening assays for testing of derivatives of the Vif antagonist RN-18 and rational designed inhibitors targeting the direct interaction between Vif and ElonginC. As a result of the compound testing it was shown, that in contrast to the published data RN-18 is cytotoxic and generates a false-positive signal in the A3G degradation assay. Among the rational designed Vif-ElonginC interaction inhibitors one compound exhibited a strong inhibitory effect on A3G degradation in an initial screening campaign.

Taken together, screening assays for the precise identification of specific inhibitors of the A3G degradation were successfully established. These screening assays will accelerate the identification of novel anti-HIV agents.

8. Literatur

- Aiyar, A., Xiang, Y. & Leis, J. (1996).** Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. *Methods Mol Biol* **57**, 177-191.
- Albin, J. S. & Harris, R. S. (2010).** Interaction of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics. *Expert Rev Mol Med* **12**, e4.
- Albin, J. S., LaRue, R. S., Weaver, J. A., Brown, W. L., Shindo, K., Harjes, E., Matsuo, H. & Harris, R. S. (2010).** A single amino acid in human APOBEC3F alters susceptibility to HIV-1 Vif. *J Biol Chem* **285**, 40785-40792.
- Alce, T. M. & Popik, P. (2004).** APOBEC3G Is Incorporated into Virus-like Particles by a Direct Interaction with HIV-1 Gag Nucleocapsid Protein. *J Biol Chem* **279**, 34083-34086.
- Ali, A., Wang, J., Nathans, R. S., Cao, H., Sharova, N., Stevenson, M. & Rana, T. M. (2012).** Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of HIV-1 Virion Infectivity Factor (Vif) Inhibitors that Block Viral Replication. *Chem Med Chem* **7**, 1217-1229.
- Amoêdo, N. D., Afonso, A. O., Cunha, S. M., Oliveira, R. H., Machado, E. S. & Soares, M. A. (2011).** Expression of APOBEC3G/3F and G-to-A hypermutation levels in HIV-1-infected children with different profiles of disease progression. *PLoS One* **6**, e24118.
- Ao, Z., Yu, Z., Wang, L., Zheng, Y. & Yao, X. (2008).** Vpr14-88-Apobec3G fusion protein is efficiently incorporated into Vif-positive HIV-1 particles and inhibits viral infection. *PLoS One* **3**, e1995.
- Ao, Z., Wang, X., Bello, A., Jayappa, K. D., Yu, Z., Fowke, K., He, X., Chen, X., Li, J., Kobinger, G. & Yao, X. (2011).** Characterization of anti-HIV activity mediated by R88-APOBEC3G mutant fusion proteins in CD4+ T cells, peripheral blood mononuclear cells, and macrophages. *Hum Gene Ther* **22**, 1225-1237.
- Arias, J. F., Iwabu, Y. & Tokunaga, K. (2011).** Structural Basis for the Antiviral Activity of BST-2/Tetherin and Its Viral Antagonism. *Front Microbiol* **2**, 250.
- Arhel, N. & Kirchhoff, F. (2010).** Host proteins involved in HIV infection: New therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 313-321.
- Armitage, A. E., Deforche, K., Chang, C. H., Wee, E., Kramer, B., Welch, J. J., Gerstoft, J., Fugger, L., McMichael, A., Rambaut, A. & Iversen, A. K. (2012).** APOBEC3G-induced hypermutation of human immunodeficiency virus type-1 is typically a discrete "all or nothing" phenomenon. *PLoS Genet* **8**:e1002550.
- Arts, E. J. & Hazuda, D. J. (2012).** HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a007161.
- Bach, D., Peddi, S., Mangeat, B., Lakkaraju, A., Strub, K. & Trono, D. (2008).** Characterization of APOBEC3G binding to 7SL RNA. *Retrovirology* **5**:54.

- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983).** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
- Beale, R. C., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Harris, R. S., Rada, C. & Neuberger, M. S. (2004).** Comparison of the differential context-dependence of DNA deamination by APOBEC enzymes: correlation with mutation spectra in vivo. *J Mol Biol* **337**, 585-596.
- Bence, N. F., Bennett, E. J. & Kopito, R. R. (2005).** Application and analysis of the GFP^u family of ubiquitin-proteasome system reporters. *Methods Enzymol* **399**, 481-490.
- Bergeron, J. R. C., Huthoff, H., Veselkov, D. A., Bevil, R. L., Simpson, P. J., Matthews, S. J., Malim, M. H. & Sanderson, M. R. (2010).** The SOCS-box of HIV-1 Vif interacts with ElonginBC by induced-folding to recruit its Cul5-containing ubiquitin ligase complex. *PLoS Pathog* **6**, e1000925.
- Bishop, K. N., Holmes, R. K., Sheehy, A. M., Davidson, N. O., Cho, S. J. & Malim, M. H. (2004).** Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* **14**, 392-396.
- Blanc, V. & Davidson, N. O. (2010).** APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**, 594-602.
- Bogerd, H. P., Doehle, B. P., Wiegand, H. L. & Cullen, B. R. (2004).** A single amino acid difference in the host APOBEC3G protein controls the primate species specificity of HIV type 1 virion infectivity factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3770-3774.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J. P. (1995).** A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297-7301.
- Briggs, J. A., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H. G. & Fuller, S. D. (2003).** Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J* **22**, 1707-1715.
- Briggs, J. A., Simon, M. N., Gross, I., Kräusslich, H. G., Fuller, S. D., Vogt, V. M. & Johnson, M. C. (2004).** The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 672-675.
- Bukrinsky, M. I., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S. & Stevenson, M. (1992).** Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6580-6584.
- Bullock, A. N., Rodriguez, M. C., Debreczeni, J. E., Songyang, Z. & Knapp, S. (2007).** Structure of the SOCS4-ElonginB/C complex reveals a distinct SOCS box interface and the molecular basis for SOCS-dependent EGFR degradation. *Structure* **15**, 1493-1504.
- Burnett, A. & Spearman, P. (2007).** APOBEC3G multimers are recruited to the plasma membrane for packaging into human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles in an RNA-dependent process requiring the NC basic linker. *J Virol* **81**, 5000-5013.

- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J. K. (1993).** Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8033-8037.
- Bushman, F., Lewinski, M., Ciuffi, A., Barr, S., Leipzig, J., Hannenhalli, S. & Hoffmann, C. (2005).** Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol* **3**, 848-858.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. (2002).** A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7877-7882.
- Cancio, R., Spadari, S. & Maga, G. (2004).** Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass. *Biochem J* **383**, 475-482.
- Cen, S., Guo, F., Niu, M., Saadatmand, J., Deflassieux, J. & Kleiman, L. (2004).** The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* **279**, 33177-33184.
- Cen, S., Peng, Z. G., Li, X. Y., Ma, J., Wang, Y. M., Fan, B., You, X. F., Wang, Y. P., Liu, F., Zhao, L. X., Yu, L. & Jiang, J. D. (2010).** Small molecular compounds inhibit HIV-1 replication through specifically stabilizing APOBEC3G. *J Biol Chem* **285**, 16546-16552.
- Center for disease control: Pneumocystis pneumonia - Los Angeles. 1981. *MMWR*. **30**:250.
- Chan, D. A., Sutphin, P. D., Yen, S. E. & Giaccia, A. J. (2005).** Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol* **15**, 6415-6426.
- Chen, K. M., Harjes, E., Gross, P. J., Fahmy, A., Lu, Y., Shindo, K., Harris, R. S. & Matsuo H. (2008).** Structure of the DNA deaminase domain of the HIV-1 restriction factor APOBEC3G. *Nature* **452**, 116-119.
- Chen, G., He, Z., Wang, T., Xu, R. & Yu, X. F. (2009).** A patch of positively charged amino acids surrounding the human immunodeficiency virus type 1 Vif SLVx4Yx9Y motif influences its interaction with APOBEC3G. *J Virol* **83**, 8674-8682.
- Chertova, E., Chertov, O., Coren, L. V., Roser, J. D., Trubey, C. M., Bess, J. W. Jr., Sowder, R. C., Barsov, E., Hood, B. L., Fisher, R. J., Nagashima, K., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lifson, J. D. & Ott, D. E. (2006).** Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol* **80**, 9039-9052.
- Chiu, Y. L., Soros, V. B., Kreisberg, J. F., Stopak, K., Yonemoto, W. & Greene, W. C. (2005).** Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* **435**, 108-114.
- Chiu, Y. L., Witkowska, H. E., Hall, S. C., Santiago, M., Soros, V. B., Esnault, C., Heidmann, T. & Greene, W. C. (2006).** High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15588-15593.

- Chiu, Y. L. & Greene, W. C. (2008).** The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol* **26**, 317-353.
- Chiu, Y. L. & Greene, W. C. (2009).** APOBEC3G: an intracellular centurion. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 689-703.
- Chiu, Y. L. (2011).** Biochemical fractionation and purification of high-molecular-mass APOBEC3G complexes. *Methods Mol Biol* **718**, 185-206.
- Cho, S. J., Drechsler, H., Burke, R. C., Arens, M. Q., Powderly, W. & Davidson, N. O. (2006).** APOBEC3F and APOBEC3G mRNA levels do not correlate with human immunodeficiency virus type 1 plasma viremia or CD4+ T-cell count. *J Virol* **80**, 2069-2072.
- Chou, T. F. & Deshaies, R. J. (2011).** Quantitative cell-based protein degradation assays to identify and classify drugs that target the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem* **286**, 16546-16554.
- Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J. R. & Bushman, F. (2005).** A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* **11**, 1287-1289.
- Ciuffi, A. (2008).** Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Curr Gene Ther* **8**, 419-429.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M-A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J. L. & Montagnier, L. (1986).** Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343-346.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. (1997).** Retroviruses. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Collier, A. C., Coombs, R. W., Schoenfeld, D. A., Bassett, R. L., Timpone, J., Baruch, A., Jones, M., Facey, K., Whitacre, C., McAuliffe, V. J., Friedman, H. M., Merigan, T. C., Reichman, R. C., Hooper, C. & Corey, L. (1996).** Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* **334**, 1011-1017.
- Conticello, S. G., Harris, R. S. & Neuberger M. S. (2003).** The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol* **13**, 2009-2013.
- Conticello, S. G., Thomas, C. J., Petersen-Mahrt, S. K. & Neuberger, M. S. (2005).** Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* **22**, 367-377.
- D'Angelo, G., Duplan, E., Vigne, P. & Frelin, C. (2003).** Cyclosporin A prevents the hypoxic adaptation by activating hypoxia-inducible factor-1 alpha Pro-564 hydroxylation. *J Biol Chem* **286**, 15406-15411.

- D'Aquila, R. T., Hughes, M. D., Johnson, V. A., Fischl, M. A., Sommadossi, J. P., Liou, S. H., Timpone, J., Myers, M., Basgoz, N., Niu, M. & Hirsch, M. S. (1996).** Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Ann Intern Med* **124**, 1019-1030.
- Dang, Y., Siew, L. M. & Zheng, Y. H. (2008).** APOBEC3G is degraded by the proteasomal pathway in a Vif-dependent manner without being polyubiquitylated. *J Biol Chem* **283**, 13124-13131.
- Dang, Y., Wang, X., Zhou, T., York, I. A. & Zheng, Y. H. (2009).** Identification of a novel WxSLVK motif in the N terminus of human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus Vif that is critical for APOBEC3G and APOBEC3F neutralization. *J Virol* **83**, 8544-8552.
- Dang, Y., Davis, R. W., York, I. A. & Zheng, Y. H. (2010a).** Identification of 81LGxGxxIxW89 and 171EDRW174 domains from human immunodeficiency virus type 1 Vif that regulate APOBEC3G and APOBEC3F neutralizing activity. *J Virol* **84**, 5741-5750.
- Dang, Y., Wang, X., York, I. A. & Zheng, Y. H. (2010b).** Identification of a critical T(Q/D/E)x5ADx2(I/L) motif from primate lentivirus Vif proteins that regulate APOBEC3G and APOBEC3F neutralizing activity. *J Virol* **84**, 8561-8570.
- DeClercq, E. (2010).** Antiretroviral drugs. *Curr Opin Pharmacol* **10**, 507-515.
- DeHart, J. L., Bosque, A., Harris, R. S. & Planelles, V. (2008).** Human immunodeficiency virus type 1 Vif induces cell cycle delay via recruitment of the same E3 ubiquitin ligase complex that targets APOBEC3 proteins for degradation. *J Virol* **82**, 9265-9272.
- Decroly, E., Vandenbranden, M., Ruyschaert, J. M., Cogniaux, J., Jacob, G. S., Howard, S. C., Marshall, G., Kompelli, A., Basak, A. & Jean, F. (1994).** The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-1 TM). *J Biol Chem* **269**, 12240-12247.
- Delebecque, F., Suspène, R., Calattini, S., Casartelli, N., Saïb, A., Froment, A., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Vartanian, J. P. & Schwartz, O. (2006).** Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* **80**, 605-614.
- Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E. & Mouscadet, J. F. (2008).** Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* **5**, 114.
- Demorest, Z. L., Li, M. & Harris, R. S. (2011).** Phosphorylation Directly Regulates the Intrinsic DNA Cytidine Deaminase Activity of Activation-induced Deaminase and APOBEC3G Protein *J Biol Chem* **286**, 26568-26575.

- Ding, Q., Chang, C. J., Xie, X., Xia, W., Yang, J. Y., Wang, S. C., Wang, Y., Xia, J., Chen, L., Cai, C., Li, H., Yen, C. J., Kuo, H. P., Lee, D. F., Lang, J., Huo, L., Cheng, X., Chen, Y. J., Li, C. W., Jeng, L. B., Hsu, J. L., Li, L. Y., Tan, A., Curley, S. A., Ellis, L. M., Dubois, R. N. & Hung, M. C. (2011). APOBEC3G promotes liver metastasis in an orthotopic mouse model of colorectal cancer and predicts human hepatic metastasis. *J Clin Invest* **121**, 4526-4536.
- Doms, R. W. & Trono, D. (2000). The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev* **14**, 2677-2688.
- Donahue, J. P., Vetter, M. L., Mukhtar, N. A. & D'Aquila, R. T. (2008). The HIV-1 Vif PLPP motif is necessary for human APOBEC3G binding and degradation. *Virology* **377**, 49-53.
- Douaisi, M., Dussart, S., Courcou, M., Bessou, G., Lerner, E. C., Decroly, E. & Vigne, R. (2005). The tyrosine kinases Fyn and Hck favor the recruitment of tyrosine-phosphorylated APOBEC3G into vif-defective HIV-1 particles. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 917-924.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. & Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**, 8463-8471.
- Ehrlich, E. S. & Yu, X. F. (2006). Lentiviral Vif: viral hijacker of the ubiquitin-proteasome system. *Int J Hematol* **83**, 208-212.
- Ejima, T., Hirota, M., Mizukami, T., Otsuka, M. & Fujita, M. (2011). An anti-HIV-1 compound that increase steady-state expression of apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G. *Int J Mol Med* **28**, 613-616.
- Elliott, J., Lynch, O. T., Suessmuth, Y., Qian, P., Boyd, C. R., Burrows, J. F., Buick, R., Stevenson, N. J., Touzelet, O., Gadina, M., Power, U. F. & Johnston, J. A. (2007). Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase. *J Virol* **7**, 3428-3436.
- Engeland, C. E., Oberwinkler, H., Schümann, M., Krause, E., Müller, G. A. & Kräusslich, H. G. (2011). The cellular protein lyric interacts with HIV-1 Gag. *J Virol* **85**, 13322-13332.
- Fehrholz, M., Kendl, S., Prifert, C., Weissbrich, B., Lemon, K., Rennick, L., Duprex, P.W., Rima, B. K., Koning, F. A., Holmes, R. K., Malim, M. H. & Schneider-Schaulies, J. (2012). The innate antiviral factor APOBEC3G targets replication of measles, mumps and respiratory syncytial viruses. *J Gen Virol* **93**, 565-576.
- Feng, Y. & Chelico, L. (2011). Intensity of deoxycytidine deamination of HIV-1 proviral DNA by the retroviral restriction factor APOBEC3G is mediated by the noncatalytic domain. *J Biol Chem* **286**, 11415-11426.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. (2009). Principles of Virology, Volume II, Human Immunodeficiency Virus Pathogenesis, pp. 165-198, 3rd edn. ASM Press, Washington, D.C.

- Foged, C. & Nielsen, H. M. (2008).** Cell-penetrating peptides for drug delivery across membrane barriers. *Expert Opin Drug Deliv* **5**, 105-117.
- Forsman, A. & Weiss, R. A. (2008).** Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol* **16**,555-560.
- Friew, Y. N., Boyko, V., Hu, W. S. & Pathak, V. K. (2009).** Intracellular interactions between APOBEC3G, RNA, and HIV-1 Gag: APOBEC3G multimerization is dependent on its association with RNA. *Retrovirology* **6**, 56.
- Fujita, M., Otsuka, M. & Sugiura, Y. (1996).** Metal-chelating inhibitors of a zinc finger protein HIV-EP1. Remarkable potentiation of inhibitory activity by introduction of SH groups. *J Med Chem* **39**, 503-507.
- Fujita, M., Akari, H., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Strebel, K. & Adachi, A. (2004).** Expression of HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome degradation. *Microbes Infect* **6**:791-798.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Siduh, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J. & Popovic, M. (1983).** Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-867.
- Gallois-Montbrun, S., Kramer, B., Swanson, C. M., Byers, H., Lynham, S., Ward, M. & Malim, M. H. (2007).** Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol* **81**, 2165-2178.
- Gallois-Montbrun, S., Holmes, R. K., Swanson, C. M., Fernández-Ocaña, M., Byers, H. L., Ward, M. A. & Malim, M. H. (2008).** Comparison of cellular ribonucleoprotein complexes associated with the APOBEC3F and APOBEC3G antiviral proteins. *J Virol* **82**, 5636-5642.
- Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H., Ozel, M., Pauli, G. & Koch, M. A. (1987).** Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**, 171-176.
- Geraerts, M., Willems, S., Baekelandt, V., Debyser, Z. & Gijssbers, R. (2006).** Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol* **6**, 34.
- Ghosh, I., Hamilton, A. D. & Regan, L. (2000).** Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: applications to the green fluorescent protein. *J Am Chem Soc* **122**, 5658-5659.
- Gilbert, P. B., McKeague, I. W., Eisen, G., Mullins, C., Guéye-NDiaye, A., Mboup, S. & Kanki, P. J. (2003).** Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med* **22**, 573-593.
- Godbey, W. T., Wu, K. K. & Mikos, A. G. (1999).** Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5177-5181.

- Goila-Gaur, R. & Strebel, K. (2008).** HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* **5**, 51.
- Goila-Gaur, R., Khan, M. A., Miyagi, E., Kao, S., Opi, S., Takeuchi, H. & Strebel, K. (2008).** HIV-1 Vif promotes the formation of high molecular mass APOBEC3G complexes. *Virology* **372**, 136-146.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992).** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-5551.
- Green, L. A., Liu, Y. & He, J. J. (2009).** Inhibition of HIV-1 infection and replication by enhancing viral incorporation of innate anti-HIV-1 protein A3G: a non-pathogenic Nef mutant-based anti-HIV strategy. *J Biol Chem* **284**, 13363-13372.
- Haché, G., Liddament, M. T. & Harris, R. S. (2005).** The retroviral hypermutation specificity of APOBEC3F and APOBEC3G is governed by the C-terminal DNA cytosine deaminase domain. *J Biol Chem* **280**, 10920-10924.
- Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Neuberger & M. S., Malim, M. H. (2003).** DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**, 803-809.
- Hassaine, G., Courcou, M., Bessou, G., Barthalay, Y., Picard, C., Olive, D., Collette, Y., Vigne, R. & Decroly, E. (2001).** The tyrosine kinase Hck is an inhibitor of HIV-1 replication counteracted by the viral vif protein. *J Biol Chem* **276**, 16885-16893.
- He, Z., Zhang, W., Chen, G., Xu, R. & Yu, X. F. (2008).** Characterization of conserved motifs in HIV-1 Vif required for APOBEC3G and APOBEC3F interaction. *J Mol Biol* **381**, 1000-1011.
- Heckman, K. L. & Pease, L. R. (2007).** Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* **2**, 924-932.
- Hemelaar, J. (2012).** The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* **18**, 182-192.
- Henriet, S., Mercenne, G., Bernacchi, S., Paillart, J. C. & Marquet, R. (2009).** Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 211-232.
- Herschhorn, A. & Hizi, A. (2010).** Retroviral reverse transcriptases. *Cell Mol Life Sci* **67**, 2717-2747.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998).** The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
- Hjerpe, R., Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., England, P. & Rodriguez, M. S. (2009).** Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin binding entities. *EMBO Rep* **10**, 1250-1258.

- Hon, W., Wilson, M. I., Harlos, K., Claridge, T. D. W., Schofield, C. J., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., Stuart, D. I. & Jones, E. Y. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL. *Nature* **417**, 975-978.
- Hu, C. D., Chinenov, Y. & Kerppola, T. K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**, 789-798.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. & Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7987-7992.
- Hultquist, J. F., McDougale, R. M., Anderson, B. D. & Harris, R. S. (2012). HIV-1 Vif and the RUNX Transcription Factors Interact with CBF β on Genetically Distinct Surfaces. *AIDS Res Hum Retroviruses* ahead of print. doi:10.1089.
- Huthoff, H. & Malim, M. H. (2007). Identification of amino acid residues in APOBEC3G required for regulation by human immunodeficiency virus type 1 Vif and Virion encapsidation. *J Virol* **81**, 3807-3815.
- Huthoff, H., Autore, F., Gallois-Montbrun, S., Fraternali, F. & Malim, M. (2009). HRNA-dependent oligomerization of APOBEC3G is required for restriction of HIV-1. *PLoS Pathog* **5**, e1000330.
- Iwatani, Y., Chan, D. S., Liu, L., Yoshii, H., Shibata, J., Yamamoto, N., Levin, J. G., Gronenborn, A. M. & Sugiura, W. (2009). HIV-1 Vif-mediated ubiquitination /degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19539-19544.
- Izumi, T., Takaori-Kondo, A., Shirakawa, K., Higashitsuji, H., Itoh, K., Io, K., Matsui, M., Iwai, K., Kondoh, H., Sato, T., Tomonaga, M., Ikeda, S., Akari, H., Koyanagi, Y., Fujita, J. & Uchiyama, T. (2009). MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* **6**:1.
- Izumi, T., Io, K., Matsui, M., Shirakawa, K., Shinohara, M., Nagai, Y., Kawahara, M., Kobayashi, M., Kondoh, H., Misawa, N., Koyanagi, Y., Uchiyama, T. & Takaori-Kondo, A. (2010). HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20798-20803.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A.V., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472.
- Jacobs, G. B., Nistal, M., Laten, A., van Rensburg, E. J., Rethwilm, A., Preiser, W., Bodem, J. & Engelbrecht, S. (2008). Molecular analysis of HIV type 1 vif sequences from Cape Town, South Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **24**, 991-994.

- Jäger, S., Kim, D. Y., Hultquist, J. F., Shindo, K., LaRue, R. S., Kwon, E., Li, M., Anderson B. D., Yen, L., Stanley, D., Mahon, C., Kane, J., Franks-Skiba, K., Cimermancic, P., Burlingame, A., Sali, A., Craik, C. S., Harris, R. S., Gross, J. D. & Krogan, N. J. (2011). Vif hijacks CBF- β to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* **481**, 371-375.
- Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J. & Navaratnam N. (2002). An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* **79**, 285-296.
- Jin, X., Brooks, A., Chen, H., Bennett, R., Reichman, R. & Smith, H. (2005). APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. *J Virol* **79**, 11513-11516.
- Jose, M., Santos-Costa, Q. & Moniz-Pereira, J. (2005). HIV-2 infection and chemokine receptors usage - clues to reduced virulence of HIV-2. *Current HIV Research* **3**, 3-16.
- Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brian, S., Makino, Y. & Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **274**, 6519-6525.
- Kamura, T., Brower, C. S., Conaway, R. C. & Conaway, J. W. (2002). A molecular basis for stabilization of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein by components of the VHL ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **277**, 30388-30393.
- Kanki, P. J., Travers, K. U., Boup, S., Hsieh, C. C., Marlink, R. G., Gueye-NDiaye, A., Siby, T., Thior, I., Hernandez-Avila, M. & Sankalé, J. L. (1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *The Lancet* **343**, 943-946.
- Kao, S., Miyagi, E., Khan, M. A., Takeuchi, H., Opi, S., Goila-Gaur, R. & Strebel, K. (2004). Production of infectious human immunodeficiency virus type 1 does not require depletion of APOBEC3G from virus-producing cells. *Retrovirology* **1**, 27.
- Kao, S., Goila-Gaur, R., Miyagi, E., Khan, M. A., Opi, S., Takeuchi, H. & Strebel, K. (2007). Production of infectious virus and degradation of APOBEC3G are separable functional properties of human immunodeficiency virus type 1 Vif. *Virology* **369**, 329-339.
- Kapuria, V., Peterson, L. F., Showalter, H. D., Kirchhoff, P. D., Talpaz, M. & Donato, N. J. (2011). Protein cross-linking as a novel mechanism of action of a ubiquitin-activating enzyme inhibitor with anti-tumor activity. *Biochem Pharmacol* **82**, 341-349.
- Karlsson G. B., Fouchier, R. A., Phogat, S., Burton, D. R., Sodroski, J. & Wyatt, R. T. (2008). The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol* **6**, 143-155.
- Kataropoulou, A., Bovolenta, C., Belfiore, A., Trabatti, S., Garbelli, A., Porcellini, S., Lupu, R. & Maga, G. (2009). Mutational analysis of the HIV-1 auxiliary protein Vif identifies independent domains important for the physical and functional interaction with HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* **37**, 3660-3669.

- Kerppola, T. K. (2006).** Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* **1**, 1278-1286.
- Khamsri, B., Fujita, M., Kamada, K., Piroozmand, A., Yamashita, T., Uchiyama, T. & Adachi, A. (2006).** Effects of lysine to arginine mutations in HIV-1 Vif on its expression and viral infectivity. *Int J Mol Med* **18**, 679-683.
- Khan, M. A., Akari, H., Kao, S., Aberham, C., Davis, D., Buckler-White, A. & Strebel, K. (2002).** Intravirion processing of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein by the viral protease may be correlated with Vif function. *J Virol* **76**, 9112-9123.
- Khan, M. A., Kao, S., Miyagi, E., Takeuchi, H., Goila-Gaur, R., Opi, S., Gipson, C. L., Parslow, T. G., Ly, H. & Strebel, K. (2005).** Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J Virol* **79**, 5870-5874.
- Khan, M. A., Goila-Gaur, R., Opi, S., Miyagi, E., Takeuchi, H., Kao, S. & Strebel, K. (2007).** Analysis of the contribution of cellular and viral RNA to the packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions. *Retrovirology* **4**:48.
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J. A. & Kaelin, W. G. (1995).** Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to ElonginC and C. *Science* **269**, 1444-1446.
- Kim, E. Y., Bhattacharya, T., Kunstman, K., Swantek, P., Koning, F. A., Malim, M. H. & Wolinsky, S. M. (2010).** Human APOBEC3G-mediated editing can promote HIV-1 sequence diversification and accelerate adaptation to selective pressure. *J Virol* **84**, 10402-10405.
- Kimbrel, E. A., Davis, T. N., Bradner, J. E. & Kung, A. L. (2009).** In vivo pharmacodynamic imaging of proteasome inhibition. *Mol Imaging* **8**, 140-147.
- Kinomoto, M., Kanno, T., Shimura, M., Ishizaka, Y., Kojima, A., Kurata, T., Sata, T. & Tokunaga, K. (2007).** All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res* **35**, 2955-2964.
- Kirchhoff, F., Schindler, M., Specht, A., Arhel, N. & Münch, J. (2008).** Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2621-2636.
- Kitamura, S., Ode, H. & Iwatani, Y. (2011).** Structural Features of Antiviral APOBEC3 Proteins are Linked to Their Functional Activities. *Front Microbiol* **2**, 258.
- Kobayashi, M., Takaori-Kondo, A., Miyauchi, Y., Iwai, K. & Uchiyama, T. (2005).** Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J Biol Chem* **280**, 18573-18578.
- Kohan, D. E. (2008).** Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney Int* **74**, 427-437.
- Koito, A. & Ikeda, T. (2011).** Intrinsic restriction activity by AID/APOBEC family of enzymes against the mobility of retroelements. *Mob Genet Elements* **1**, 197-202.

- Kourteva, Y., De Pasquale, M., Allos, T., McMunn, C. & D'Aquila, R. T. (2012).** APOBEC3G expression and hypermutation are inversely associated with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) burden in vivo. *Virology* **430**, 1-9.
- Kozak, S. L., Marin, M., Rose, K. M., Bystrom, C. & Kabat, D. (2006).** The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. *J Biol Chem* **281**, 29105-29119.
- Kreisberg, J. F., Yonemoto, W. & Greene, W. C. (2006).** Endogenous factors enhance HIV infection of tissue naive CD4 T cells by stimulating high molecular mass APOBEC3G complex formation. *J Exp Med* **203**, 865-870.
- Kremers, G. J., Goedhart, J., van den Heuvel, D. J., Gerritsen, H. C. & Gadella, T. W. J. (2007).** Improved green and blue fluorescent proteins for expression in bacteria and mammalian cells. *Biochemistry* **46**, 3775-3783.
- Langford, S. E., Ananworanich, J. & Cooper, D. A. (2007).** Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Res Ther* **4**, 11.
- Latinovic, O., Kuruppu, J., Davis, C., Le, N. & Heredia, A. (2009).** Pharmacotherapy of HIV-1 Infection: Focus on CCR5 Antagonist Maraviroc. *Clin Med Ther* **1**, 1497-1510.
- Larijani, M. & Martin, A. (2012).** The biochemistry of activation-induced deaminase and its physiological functions. *Semin Immunol* **24**, 255-263.
- La Rue, R. S., Lengyel, J., Jónsson, S. R., Andrésdóttir, V. & Harris, R. S. (2010).** Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. *J Virol* **84**, 8193-8201.
- Lee, T. H., Coligan, J. E., Allan, J. S., McLane, M. F., Groopman, J. E. & Essex, M. (1986).** A new HTLV-III/LAV protein encoded by a gene found in cytopathic retroviruses. *Science* **231**, 1546-1549.
- Lee, D. H. & Goldberg, A. L. (1998).** Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**, 397-403.
- Lei, Y. C., Hao, Y. H., Zhang, Z. M., Tian, Y. J., Wang, B. J., Yang, Y., Zhao, X. P., Lu, M. J., Gong, F. L. & Yang, D. L. (2006).** Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* **12**, 4492-4497.
- Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K.E., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Von Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D.A. & Hanenberg, H. (2003).** Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther* **14**, 509-519.
- Levy, J. A. (2009).** HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS* **23**, 147-160.

- Li, L., Liang, D., Li, J. Y. & Zhao, R. Y. (2008).** APOBEC3G-UBA2 fusion as a potential strategy for stable expression of APOBEC3G and inhibition of HIV-1 replication. *Retrovirology* **5**, 72.
- Li, X. S., Trojer, P., Matsumura, T., Treisman, J. E. & Tanese, N. (2010).** Mammalian SWI/SNF-A subunit BAF250/ARID1 is an E3 ubiquitin ligase that targets histone H2B. *Mol Cell Biol* **30**, 1673-1688.
- Liddament, M. T., Brown, W. L., Schumacher, A. J. & Harris, R. S. (2004).** APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* **14**, 1385-1391.
- Lisztwan, J., Imbert, G., Wirbelauer, C., Gstaiger, M. & Krek, W. (1999).** The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev* **13**, 1822-1833.
- Liu, B., Yu, X., Luo, K., Yu, Y. & Yu, X. F. (2004).** Influence of primate lentiviral Vif and proteasome inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 virion packaging of APOBEC3G. *J Virol* **78**, 2072-2081.
- Liu, B., Sarkis, P. T., Luo, K., Yu, Y. & Yu, X. F. (2005).** Regulation of Apobec3F and human immunodeficiency virus type 1 Vif by Vif-Cul5-ElonB/C E3 ubiquitin ligase. *J Virol* **79**, 9579-9587.
- Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M. & Poeschla, E. M. (2004).** Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *J Biol Chem* **279**, 55570-55577.
- Llano, M., Saenz, D. T., Meehan, A., Wongthida, P., Peretz, M., Walker, W. H., Teo, W., Poeschla, E. M. (2006).** An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science* **314**, 461-464.
- Lu, P. & Feng, M. G. (2008).** Bifunctional enhancement of a beta-glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**, 579-587.
- Luo, K., Liu, B., Xiao, Z., Yu, Y., Yu, X., Gorelick, R. & Yu, X. F. (2004).** Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging. *J Virol* **78**, 11841-11852.
- Luo, K., Xiao, Z., Ehrlich, E., Yu, Y., Liu, B., Zheng, S. & Yu, X. F. (2005).** Primate lentiviral virion infectivity factors are substrate receptors that assemble with cullin 5-E3 ligase through a HCCH motif to suppress APOBEC3G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11444-11449.
- Luo, K., Ehrlich, E., Xiao, Z., Zhang, W., Ketner, G. & Yu, X. F. (2007).** Adenovirus E4orf6 assembles with Cullin5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase through an HIV/SIV Vif-like BC-box to regulate p53. *FASEB J* **21**, 1742-1750.
- Lv, W., Liu, Z., Jin, H., Yu, X., Zhang, L. & Zhang, L. (2007).** Three-dimensional structure of HIV-1 VIF constructed by comparative modeling and the function characterization analyzed by molecular dynamics simulation. *Org Biomol Chem* **21**, 617-626.

- Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debysers, Z. & Engelborghs, Y. (2003).** LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* **278**, 33528-33539.
- Malim, M. H. & Bieniasz, P. D. (2012).** HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006940.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L. & Trono, D. (2003).** Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**, 99-103.
- Mangeat, B., Turelli, P., Liao, S. & Trono, D. (2004).** A single amino acid determinant governs the species-specific sensitivity of APOBEC3G to Vif action. *J Biol Chem* **279**, 14481-14483.
- Maranchie, J. K., Vasselli, J. R., Riss, J., Bonifacino, J. S., Linehan, W. M., Klausner, R. D. (2002).** The contribution of VHL substrate binding and HIF1- α to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* **1**, 247-255.
- Marchand, C., Johnson, A. A., Semenova, E. & Pommier, Y. (2006).** Mechanisms and inhibition of HIV integration. *Drug Discov Today Dis Mech* **3**, 253-260.
- Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L. & Kabat, D. (2003).** HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **9**, 1398-1403.
- Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C. C., Dia, M. C. & Gueye, E. H. (1994).** Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* **265**, 1587-1590.
- Martin, K. L., Johnson, M. & D'Aquila, R. T. (2011).** APOBEC3G complexes decrease human immunodeficiency virus type 1 production. *J Virol* **85**, 9314-9326.
- Mehle, A., Goncalves, J., Santa-Marta, M., McPike, M. & Gabuzda, D. (2004a).** Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev* **18**, 2861-2866.
- Mehle, A., Strack, B., Ancuta, P., Zhang, C., McPike, M. & Gabuzda, D. (2004b).** Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **279**, 7792-7798.
- Mehle, A., Thomas, E. R., Rajendran, K. S. & Gabuzda, D. (2006).** A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection. *J Biol Chem* **281**, 17259-17265.
- Mehle, A., Wilson, H., Zhang, C., Brazier, A. J., McPike, M., Pery, E. & Gabuzda, D. (2007).** Identification of an APOBEC3G binding site in human immunodeficiency virus type 1 Vif and inhibitors of Vif-APOBEC3G binding. *J Virol* **81**, 13235-13241.

- Menéndez-Benito, V., Heessen, S. & Dantuma N. P. (2005).** Monitoring of ubiquitin-dependent proteolysis with green fluorescent protein substrates. *Methods Enzymol* **399**, 490-511.
- Mercenne, G., Bernacchi, S., Richer, D., Bec, G., Henriët, S., Paillart, J. C. & Marquet, R. (2010).** HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res* **38**, 633-646.
- Merten, O. W. (2004).** State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *J Gene Med* **6**, 105-124.
- Miller, M. D., Farnet, C. M. & Bushman, F. D. (1997).** Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* **71**, 5382-5390.
- Miller, J. H., Presnyak, V. & Smith, H. C. (2007).** The dimerization domain of HIV-1 viral infectivity factor Vif is required to block virion incorporation of APOBEC3G. *Retrovirology* **4**, 81.
- Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St Clair, M. H., Lehrmann, S. N., Gallo, R. C., Bolognesi, D., Barry, D. W. & Broder, S. (1985).** 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7096-7100.
- Monajemi, M., Woodworth, C. F., Benkaroun, J., Grant, M. & Larijani, M. (2012).** Emerging complexities of APOBEC3G action on immunity and viral fitness during HIV infection and treatment. *Retrovirology* **9**, 35.
- Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Muckenfuss, H., Hamdorf, M., Held, U., Perkovic, M., Löwer, J., Cichutek, K., Flory, E., Schumann, G. G. & Münk, C. (2006).** APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J Biol Chem* **281**, 22161-22172.
- Mussil, B., Sauermann, U., Motzkus, D., Stahl-Hennig, C. & Sopper, S. (2011).** Increased APOBEC3G and APOBEC3F expression is associated with low viral load and prolonged survival in simian immunodeficiency virus infected rhesus monkeys. *Retrovirology* **8**, 77.
- Nakayama, E. E. & Shioda, T. (2012).** Role of human Trim5 α in intrinsic immunity. *Front Microbiol* **3**, 97.
- Nathans, R., Cao, H., Sharova, N., Ali, A., Sharkey, M., Stranska, R., Stevenson, M., Rana, T.M. (2008).** Small-molecule inhibition of HIV-1 Vif. *Nat Biotechnol* **26**, 1187-1192.
- Navarro, F., Bollman, B., Chen, H., König, R., Yu, Q., Chiles, K. & Landau, N. R. (2005).** Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* **333**, 374-386.
- Neil, S. J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. (2008).** Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**, 425-430.

- Nowotny, B., Schneider, T., Pradel, G., Schirmeister, T., Rethwilm, A. & Kirschner, M. (2010).** Inducible APOBEC3G-Vif double stable cell line as a high-throughput screening platform to identify antiviral compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 78-87.
- Oberste, M. S. & Gonda, M. A. (1992).** Conservation of amino-acid sequence motifs in lentivirus Vif proteins. *Virus Genes* **6**, 95-102.
- Ohad, N., Shichrur, K. & Yalovsky, S. (2007).** The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. *Plant Physiol* **145**, 1090-1099.
- Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffmann, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V. & Kaelin, W. G. (2000).** Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* **2**, 423-427.
- Okumura, A., Alce, T., Lubyova, B., Ezelle, H., Strebel, K. & Pitha, P. M. (2008).** HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology* **373**, 85-97.
- Okumura, F., Matsuzaki, M., Nakatsukasa, K. & Kamura, T. (2012).** The Role of Elongin BC-Containing Ubiquitin Ligases. *Front Oncol* **2**, 10.
- Opi, S., Takeuchi, H., Kao, S., Khan, M. A., Miyagi, E., Goila-Gaur, R., Iwatani, Y., Levin, J. G. & Strebel, K. (2006).** Monomeric APOBEC3G is catalytically active and has antiviral activity. *J Virol* **80**, 4673-4682.
- Otsuka, M., Fujita, M., Sugiura, Y., Yamamoto, T., Inoue, J., Maekawa, T. & Ishii, S. (1997).** Synthetic inhibitors of regulatory proteins involved in the signaling pathway of the replication of human immunodeficiency virus 1. *Bioorg Med Chem* **5**, 205-215.
- Ott, D. E. (2008).** Cellular proteins detected in HIV-1. *Rev Med Virol* **18**, 159-175.
- Otto, M., (2010).** Assessment of test systems to characterize novel inhibitors of the A3G/HIV-Vif interaction identified in drug screenings. Master thesis, Institute for Virology and Immunobiology, University of Würzburg.
- Pace, C., Keller, J., Nolan, D., James, I., Gaudieri, S., Moore, C. & Mallal, S. (2006).** Population level analysis of human immunodeficiency virus type 1 hypermutation and its relationship with APOBEC3G and vif genetic variation. *J Virol* **80**, 9259-9269.
- Palmer, E & Goldsmith, C. S. (1988).** Ultrastructure of human retroviruses. *J Electron Microscop Tech* **8**, 3-15.
- Paprotka, T., Venkatachari, N. J., Chaipan, C., Burdick, R., Delviks-Frankenberry, K. A., Hu, W. S. & Pathak, V. K. (2010).** Inhibition of xenotropic murine leukemia virus-related virus by APOBEC3 proteins and antiviral drugs. *J Virol* **84**, 5719-5729.
- Parker, R. & Sheth, U. (2007).** P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* **25**, 635-646.

- Pasquato, A., Dettin, M., Basak, A., Gambaretto, R., Tonin, L., Seidah, N. G. & Di Bello, C. (2007).** Heparin enhances the furin cleavage of HIV-1 gp160 peptides. *FEBS Lett* **581**, 5807-5813.
- Pernot, M., Vanderesse, R., Frochot, C., Guillemin, F. & Barberi-Heyob, M. (2011).** Stability of peptides and therapeutic success in cancer. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **7**, 793-802.
- Pery, E., Rajendran, K. S., Brazier, A. J. & Gabuzda, D. (2009).** Regulation of APOBEC3 proteins by a novel YXXL motif in human immunodeficiency virus type 1 Vif and simian immunodeficiency virus SIVagm Vif. *J Virol* **83**, 2374-2381.
- Pickart, C. M. (2001).** Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-533.
- Popovic, M., Sarin, P. S., Robert-Guroff, M., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Minowada, J. & Gallo, R. C. (1983).** Isolation and transmission of human retrovirus (human T-cell leukemia virus). *Science* **219**, 856-859.
- Porcellini, S., Alberici, L., Gubinelli, F., Lupo, R., Olgiati, C., Rizzardi, G. P. & Bovolenta, C. (2009).** The F12-Vif derivative Chim3 inhibits HIV-1 replication in CD4+ T lymphocytes and CD34+-derived macrophages by blocking HIV-1 DNA integration. *Blood* **113**, 3443-3452.
- Porcellini, S., Gubinelli, F., Alberici, L., Piovani, B. M., Rizzardi, G. P. & Bovolenta, C. (2010).** Chim3 confers survival advantage to CD4+ T cells upon HIV-1 infection by preventing HIV-1 DNA integration and HIV-1-induced G2 cell-cycle delay. *Blood* **115**, 4021-4029.
- Poropatich, K. & Sullivan, D. J. (2011).** Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J Gen Virol* **92**, 247-268.
- Reingewertz, T. H., Benyamini, H., Lebendiker, M., Shalev, D. E. & Friedler, A. (2009).** The C-terminal domain of the HIV-1 Vif protein is natively unfolded in its unbound state. *Protein Eng Des Sel* **22**, 281-287.
- Reingewertz, T. H., Shalev, D. E. & Friedler, A. (2010).** Structural disorder in the HIV-1 Vif protein and interaction-dependent gain of structure. *Protein Pept Lett* **17**, 988-998.
- Rogozin, I. B., Basu, M. K., Jordan, I. K., Pavlov, Y. I. & Koonin, E. V. (2005).** APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle* **4**, 1281-1285.
- Romani, B., Engelbrecht, S. & Glashoff, R. H. (2010).** Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* **91**, 1-12.
- Russell, R. A., Wiegand, H. L., Moore, M. D., Schäfer, A., McClure, M. O. & Cullen, B. R. (2005).** Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol* **79**, 8724-8731.

- Russell, R. A. & Pathak, V. K. (2007).** Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol* **81**, 8201-8210.
- Russell, R. A., Smith, J., Barr, R., Bhattacharyya, D. & Pathak, V. K. (2009).** Distinct Domains within APOBEC3G and APOBEC3F Interact with Separate Regions of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif. *J Virol* **83**, 1992-2003.
- Sadler, H. A., Stenglein, M. D., Harris, R. S. & Mansky, L. M. (2010).** APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. *J. Virol.* **84**, 7396-7404.
- Santa-Marta, M., da Silva, F. A., Fonseca, A. M. & Goncalves, J. (2005).** HIV-1 Vif can directly inhibit apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G-mediated cytidine deamination by using a single amino acid interaction and without protein degradation. *J Biol Chem* **280**, 8765-8775.
- Sasada, A., Takaori-Kondo, A., Shirakawa, K., Kobayashi, M., Abudu, A., Hishizawa, M., Imada, K., Tanaka, Y. & Uchiyama, T. (2005).** APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* **2**, 32.
- Schäfer, A., Bogerd, H. P. & Cullen, B. R. (2004).** Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology* **328**, 163-168.
- Schmitt, K., Hill, M. S., Ruiz, A., Culley, N., Pinson, D. M., Wong, S. W. & Stephens, E. B. (2009).** Mutations in the highly conserved SLQYLA motif of Vif in a simian-human immunodeficiency virus result in a less pathogenic virus and are associated with G-to-A mutations in the viral genome. *Virology* **383**, 362-372.
- Schmitt, K., Hill, M. S., Liu, Z., Ruiz, A., Culley, N., Pinson, D. M. & Stephens, E. B. (2010).** Comparison of the replication and persistence of simian-human immunodeficiency viruses expressing Vif proteins with mutation of the SLQYLA or HCCH domains in macaques. *Virology* **404**, 187-203.
- Schoenfeld, A. R., Davidowitz, E. J. & Burk, R. D. (2000).** Elongin BC complex prevents degradation of von Hippel-Lindau tumor suppressor gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8507-8512.
- Schröfelbauer, B., Chen, D. & Landau, N. R. (2004).** A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3927-3932.
- Schröfelbauer, B., Senger, T., Manning, G. & Landau, N. R. (2006).** Mutational alteration of human immunodeficiency virus type 1 Vif allows for functional interaction with nonhuman primate APOBEC3G. *J Virol* **80**, 5984-5991.
- Schumacher, A. J., Haché, G., MacDuff, D. A., Brown, W. L. & Harris, R. S. (2008).** The DNA Deaminase Activity of Human APOBEC3G Is Required for Ty1, MusD, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Restriction. *J Virol* **82**, 2652-2660.

- Sekigawa, I., Kaneko, H., Neoh, L. P., Takeda-Hirokawa, N., Akimoto, H., Hishikawa, T., Hashimoto, H., Hirose, S., Yamamoto, N. & Kaneko, Y. (1998).** Differences of HIV envelope protein between HIV-1 and HIV-2: possible relation to the lower virulence of HIV-2. *Viral Immunol* **11**, 1-8.
- Shao, Q., Wang, Y., Hildreth, J. E. & Liu, B. (2010).** Polyubiquitination of APOBEC3G is essential for its degradation by HIV-1 Vif. *J Virol* **84**, 4840-4844.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. (2002).** Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-650.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C. & Malim, M. H. (2003).** The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **11**, 1404-1407.
- Shyu, Y. J., Liu, H., Deng, X. & Hu, C. D. (2006).** Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *BioTechniques* **40**, 61-66.
- Shirakawa, K., Takaori-Kondo, A., Kobayashi, M., Tomonaga, M., Izumi, T., Fukunaga, K., Sasada, A., Abudu, A., Miyauchi, Y., Akari, H., Iwai, K. & Uchiyama, T. (2006).** Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. *Virology* **344**, 263-266.
- Sierra, S., Kupfer, B. & Kaiser, R. (2004).** Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* **34**, 233-244.
- Smith, J. L. & Pathak, V. K. (2010).** Identification of specific determinants of human APOBEC3F, APOBEC3C, and APOBEC3DE and African green monkey APOBEC3F that interact with HIV-1 Vif. *J Virol* **84**, 12599-12608.
- Sodroski, J., Goh, W. C., Rosen, C., Tartar, A., Portetelle, D., Burny, A. & Haseltine, W. (1986).** Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with sor gene deletions. *Science* **231**, 1549-1553.
- Soros, V. B., Yonemoto, W. & Greene, W. C. (2007).** Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog* **3**:15.
- Spann, K. M., Tran, K. C., Chi, B., Rabin, R. L. & Collins, P. L. (2004).** Suppression of the induction of alpha, beta, and gamma interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *J Virol* **78**, 4363-4369.
- Stanley, B. J., Ehrlich, E. S., Short, L., Yu, Y., Xiao, Z., Yu, X. F. & Xiong, Y. (2008).** Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 Ubiquitin ligase assembly. *J Virol* **82**, 8656-8663
- Staszewski, R. (1984).** Cloning by limiting dilution: an improved estimate that an interesting culture is monoclonal. *Yale J Biol Med* **57**, 865-868.

- Staszewski, S., Miller, V., Rehmet, S., Stark, T., De Créé, J., De Brabander, M., Peeters, M., Andries, K., Moeremans, M., De Raeymaeker, M., Pearce, G., Van den Broeck, R., Verbiest, W. & Stoffels, P. (1996). Virological and immunological analysis of a triple combination pilot study with zidovudine, lamivudine and zalcitabine in HIV-1-infected patients. *AIDS* **10**, 1-7.
- Stebbins, C. E., Kaelin, W. G. & Pavletich, N. P. (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* **284**, 455-461.
- Stenglein, M. D., Matsuo, H. & Harris, R. S. (2008). Two regions within the amino-terminal half of APOBEC3G cooperate to determine cytoplasmic localization. *J Virol* **82**, 9591-9599.
- Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W. & Greene, W. C. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* **12**, 591-601.
- Stopak, K. S., Chiu, Y. L., Kropp, J., Grant, R. M. & Greene, W. C. (2007). Distinct Patterns of Cytokine Regulation of APOBEC3G Expression and Activity in Primary Lymphocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *J Biol Chem* **282**, 3539-3546.
- Straub, C. P., Lau, W. H., Preston, F. M., Headlam, M. J., Gorman, J. J., Collins, P. L. & Spann, K. M. (2011). Mutation of the elongin C binding domain of human respiratory syncytial virus non-structured protein 1 (NS1) results in degradation of NS1 and attenuation of the virus. *Virol J* **8**, 252.
- Strebel, K. (2007). HIV accessory genes Vif and Vpu. *Adv Pharmacol* **55**, 199-232.
- Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P. & Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component Tim5a restricts HIV-1 infection in Old world monkeys. *Nature* **427**, 848-853.
- Sundquist, W. I. & Kräusslich, H. G. (2012). HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006924.
- Suspène, R., Sommer, P., Henry, M., Ferris, S., Guétard, D., Pochet, S., Chester, A., Navaratnam, N., Wain-Hobson, S. & Vartanian, J. P. (2004). APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* **32**, 2421-2429.
- Svarovskaia, E. S., Xu, H., Mbisa, J. L., Barr, R., Gorelick, R. J., Ono, A., Freed, E. O., Hu, W. S. & Pathak, V. K. (2004). Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem* **279**, 35822-35828.
- Techtmann, S. M., Ghirlando, R., Kao, S., Strebel, K. & Maynard, E. L. (2012). Hydrodynamic and functional analysis of HIV-1 Vif oligomerization. *Biochemistry* **51**, 2078-2086.

- Thorne, N., Auld, D. S. & Inglese, J. (2010).** Apparent activity in highthroughput screening: origins of compound dependent assay interference. *Curr Opin Chem Biol* **14**,315-324.
- Truong, K. & Ikura, M. (2001).** The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 573-578.
- Ulunga, N. K., Sarr, A. D., Thakore-Meloni, S., Sankalé, J. L., Eisen, G. & Kanki, P. J. (2008).** Relationship between human immunodeficiency type 1 infection and expression of human APOBEC3G and APOBEC3F. *J Infect Dis* **198**, 486-492.
- Vallanti, G., Lupo, R., Federico, M., Mavilio, F. & Bovolenta, C. (2005).** T Lymphocytes transduced with a lentiviral vector expressing F12-Vif are protected from HIV-1 infection in an APOBEC3G-independent manner. *Mol Ther* **12**, 697-706.
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R. L., Mitchell, R., Johnson, M. C., Stephens, E. B. & Guatelli, J. (2008).** The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 released and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* **3**, 245-252.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. & Khrestchatsky, M. (2010).** Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* **15**, 40-56.
- Vonica, A., Rosa, A., Arduini, B. L. & Brivanlou, A. H. (2011).** APOBEC2, a selective inhibitor of TGF β signaling, regulates left-right axis specification during early embryogenesis. *Dev Biol* **350**, 13-23.
- von Schwedler, U., Song, J., Aiken, C. & Trono, D. (1993).** Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* **67**, 4945-4955.
- Wang, T., Tian, C., Zhang, W., Luo, K., Sarkis, P. T., Yu, L., Liu, B., Yu, Y. & Yu, X. F. (2007).** 7SL RNA mediates virion packaging of the antiviral cytidine deaminase APOBEC3G. *J Virol* **81**, 13112-13124.
- Wang, Y., Shao, Q., Yu, X., Kong, W., Hildreth, J. E. & Liu, B. (2011).** N-terminal hemagglutinin tag renders lysine-deficient APOBEC3G resistant to HIV-1 Vif-induced degradation by reduced polyubiquitination. *J Virol* **85**, 4510-4519.
- Wichroski, M. J., Robb, G. B. & Rana, T. M. (2006).** Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathog* **2**, e41.
- Wissing, S., Montano, M., Garcia-Perez, J. L., Moran, J. V. & Greene, W. C. (2011).** Endogenous APOBEC3B restricts LINE-1 retrotransposition in transformed cells and human embryonic stem cells. *J Biol Chem* **286**, 36427-36437.
- Wolfe, L. S., Stanley, B. J., Liu, C., Eliason, W. K. & Xiong, Y. (2010).** Dissection of the HIV Vif interaction with human E3 ubiquitin ligase. *J Virol* **84**, 7135-7139.

- Woodward, C. L. & Chow, S. A. (2010).** The nuclear pore complex: a new dynamic in HIV-1 replication. *Nucleus* **1**, 18-22.
- Xiao, Z., Xiong, Y., Zhang, W., Tan, L., Ehrlich, E., Guo, D. & Yu X. F. (2007).** Characterization of a novel Cullin5 binding domain in HIV-1 Vif. *J Mol Biol* **373**, 541-550.
- Xu, H., Svarovskaia, E. S., Barr, R., Zhang, Y., Khan, M. A., Strebel, K. & Pathak, V. K. (2004).** A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5652-5657.
- Xu, H., Chertova, E., Chen, J., Ott, D. E., Roser, J. D., Hu, W. S. & Pathak, V. K. (2007).** Stoichiometry of the antiviral protein APOBEC3G in HIV-1 virions. *Virology* **360**, 247-256.
- Yamashita, T., Kamada, K., Hatcho, K., Adachi, A. & Nomaguchi, M. (2008).** Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F. *Microbes Infect* **10**, 1142-1149.
- Yang, B., Gao, L., Li, L., Lu, Z., Fan, X., Patel, C. A., Pomerantz, R. J., DuBois, G. C. & Zhang, H. (2003).** Potent suppression of viral infectivity by the peptides that inhibit multimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vif proteins. *J Biol Chem* **278**, 6596-6602.
- Yang, H., Wang, J., Jia, X., McNatt, M. W., Zang, T., Pan, B., Meng, W., Wang, H. W., Bieniasz, P. D. & Xiong, Y. (2010).** Structural insight into the mechanisms of enveloped virus tethering by tetherin. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 18428-18432.
- Yang, X., Goncalves, J. & Gabuzda, D. (1996).** Phosphorylation of Vif and its role in HIV-1 replication. *J Biol Chem* **271**, 10121-10129.
- Yang, X. & Gabuzda, D. (1998).** Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein. *J Biol Chem* **273**, 29879-29887.
- Yang, Y., Sun, Y. & Zhang, H. (2001).** The multimerization of human immunodeficiency virus type I Vif protein: a requirement for Vif function in the viral life cycle. *J Biol Chem* **276**, 4889-4893.
- Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R. M., Tsai, Y. C., Lorick, K. L., Ludwig, R. L., Pierre, S. A., Jensen, J. P., Davydov, I. V., Oberoi, P., Li, C. C., Kenten, J. H., Beutler, J. A., Vousden, K. H. & Weissman, A. M. (2007).** Inhibitors of Ubiquitin-Activating Enzyme (E1), a New Class of Potential Cancer Therapeutics. *Cancer Res* **67**, 9472-9481.
- Yasukawa, T., Kamura, T., Kitajima, S., Conaway, R. C., Conaway, J. W. & Aso, T. (2008).** Mammalian Elongin A complex mediates DNA-damage-induced ubiquitylation and degradation of Rpb1. *EMBO J* **27**, 3256-3266.
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P. & Yu, X. F. (2003).** Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**, 1056-1060.

Yu, Y., Xiao, Z., Ehrlich, E. S., Yu, X. & Yu, X. F. (2004). Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev* **18**, 2867-2872.

Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R. J., Zhang, C., Arunachalam, S. C. & Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**, 94-98.

Zhang, J.H., Chung, T.D. & Oldenburg, K.R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* **4**, 67-73.

Zhang, W., Chen, G., Niewiadomska, A. M., Xu, R. & Yu, X. F. (2008). Distinct determinants in HIV-1 Vif and human APOBEC3 proteins are required for the suppression of diverse host anti-viral proteins. *PLoS One* **3**, e3963.

Zhang, W., Du, J., Yu, K., Wang, T., Xiong Yong, X. & Yu, X. F. (2010). Association of Potent Human Antiviral Cytidine Deaminases with 7SL RNA and Viral RNP in HIV-1 Virions. *J Virol* **84**, 12903-12913.

Zhang, W., Du, J., Evans, S. L., Yu, Y. & Yu, X. F. (2011). T-cell differentiation factor CBF- β regulates HIV-1 Vif-mediated evasion of host restriction. *Nature* **481**, 376-379.

Zuo, T., Liu, D., Lv, W., Wang, X., Wang, J., Lv, M., Huang, W., Wu, J., Zhang, H., Jin, H., Zhang, L., Kong, W. & Yu, X. (2012). Small-Molecule Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Targeting the Interaction between Vif and ElonginC. *J Virol* **86**, 5497-5507.

9. Abkürzungen

A	Ampere
α-	alpha oder anti
Abb.	Abbildung
aa	Aminosäure
A3G	APOBEC3G
AGM	<i>African green monkey</i>
AID	<i>activation induced deaminase</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
APOBEC3G	<i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATV	antibiotic-trypsin-Versene
BiFC	<i>Biomolecular Fluorescence Complementation</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
c	Centi (10 ⁻²)
°C	Grad Celsius
cPPT	<i>central polypurine tract</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
CRI	Ko-Rezeptorinhibitor
CTD	C-terminale Domäne
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECMV	Encephalomyocarditis Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1α	<i>Elongation factor 1 α</i>
EIAV	<i>equine infectious anemia virus</i>
EYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
FI	Fusionsinhibitor
fwd	<i>forward</i>
g	Gramm
x g	Relative Zentrifugalkraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
h	Stunden
HAART	hochaktive Antiretrovirale Therapie
HBV	Hepatitis B Virus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIF1-α	<i>Hypoxia inducible factor 1-α</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase

RSV	respiratorisches Synzytia-Virus
HTLV	humanes T-Zell-Leukämievirus
HTS	<i>High-throughput screening</i>
Ig	Immunglobulin
IN	Integrase
INI	Integraseinhibitor
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
k	Kilo (10^3)
L	Liter
LAV	lymphadenopathy-assoziiertes Virus
LB	Luria-Bertani
LINE	<i>long interspersed nucleotide element</i>
LTNP	<i>long-term nonprogressors</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
M	Molarität (mol/L)
m	Milli (10^{-3})
m	Meter
Mab	Monoklonaler Antikörper
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromid
MoMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MOPS	3-(N-morpholino)Propansulfonsäure
MuV	Mumpsvirus
MV	Masernvirus
MW	Molekulargewicht in g/mol
n	Nano (10^{-9})
n/a	nicht auswertbar
NC	Nukleokapsidprotein
NNRTI	Nichtnukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRTI	Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithin-Decarboxylase
ODDD	<i>Oxygen dependent degradation domain</i>
Pab	Polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
pH	potentia Hydrogenii
PI	Proteaseinhibitor
PIC	Präintegrationskomplex
psi	virales Verpackungssignal
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRE	<i>Rev response element</i>
RSV	Rous-Sarkoma-Virus
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase

s	Sekunden
SBFP2	<i>strongly enhanced blue fluorescent protein</i>
S/B	<i>Signal to background ratio</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Synthetisches Intron
SINE	<i>short interspersed nucleotide element</i>
SIV	simianes Immundefizienz-Virus
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TetR	Tet-Repressorprotein
TPEN	N,N,N',N',-Tetrakis(2-pyridylmethyl)Ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymaktivität (1 U entspricht dem Umsatz von 1 µmol Substrat/min)
Ub	Ubiquitin
V	Volt
VHL	Von Hippel-Lindau
Vif	<i>Virion infectivity factor</i>
VL	Volllänge
VSV-G	Vesikular Stomatitis Virus Glykoprotein
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
WPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
wt	Wildtyp
XMRV	<i>human exogenous gammaretrovirus</i>
µ	Micro (10 ⁻⁶)

Buchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	Einbuchstaben-Code	Dreibuchstaben-Code
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamat	E	Glu
Glutamin	Q	Gln
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

10. Veröffentlichungen

Publikationen

Nowotny, B., Schneider, T., Pradel, G., Schirmeister, T., Rethwilm, A. & Kirschner, M. (2010). Inducible APOBEC3G-Vif double stable cell line as a high-throughput screening platform to identify antiviral compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 78-87.

Vorträge

1st International IRTG1522 Symposium, New anti-HIV therapeutics -Development of screening systems based on APOBEC3G-Vif interaction, 26-28 Februar 2009, Stellenbosch (SA)

2nd International IRTG1522 Symposium, New antiretrovirals -The APOBEC3G-Vif axis as a new promising drug target, 14-15 May 2010, Bad Staffelstein

3rd International IRTG1522 Symposium, The APOBEC3G-Vif interaction as a novel target for antiretroviral therapy ,24-26 Februar 2011, Stellenbosch (SA)

International IRTG Meeting “HIV and associated infectious diseases”, Vif-induced APOBEC3G degradation as novel drug target for HIV-therapy, 19-20 Januar 2012, Würzburg

4th International IRTG1522 Symposium, Screening assays for the identification of small-molecule compounds inhibiting the Vif-induced A3G degradation, 24-25 Juni 2012, Würzburg

Poster

Nowotny, B., Schneider, T., Pradel, G., Schirmeister, T., Rethwilm, A. & Kirschner, M., An inducible APOBEC3G-Vif double stable cell line as a high throughput screening platform to identify antiviral compounds, 12th European AIDS Conference, 11-14 November 2009, Köln

Nowotny, B., Rethwilm, A. & Kirschner, M., Quantification of the HIV-1 Vif-ElonginC interaction by a new on bimolecular fluorescence complementation (BiFC) based assay, International Molecular Life Sciences Symposium, 25-28 September 2011, Frankfurt a. M.

Nowotny, B., Rethwilm, A. & Kirschner, M., Reporter gene vectors to monitor signal transduction pathways in cancer cells, 6th International GALS Symposium “BioBang”, 19-20 Oktober 2011, Würzburg

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Rethwilm für seine freundliche Unterstützung und für sein großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Zudem möchte ich ihm herzlich dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat unter seiner Leitung am Institut für Virologie der Universität Würzburg zu promovieren.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Dr. Marc Kirschner für die Bereitstellung des Themas als auch für seine umfassende und unermüdliche Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Ich möchte mich besonders bei Dr. Gabriele Pradel für ihr Interesse an meiner Arbeit, ihre Unterstützung auch in schwierigen Situationen, und für die Übernahmen der Zweitkorrektur bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Theresa Kreuzahler für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft. Darüber hinaus möchte ich allen ehemaligen Mitgliedern der AG Kirschner für ihre Unterstützung danken.

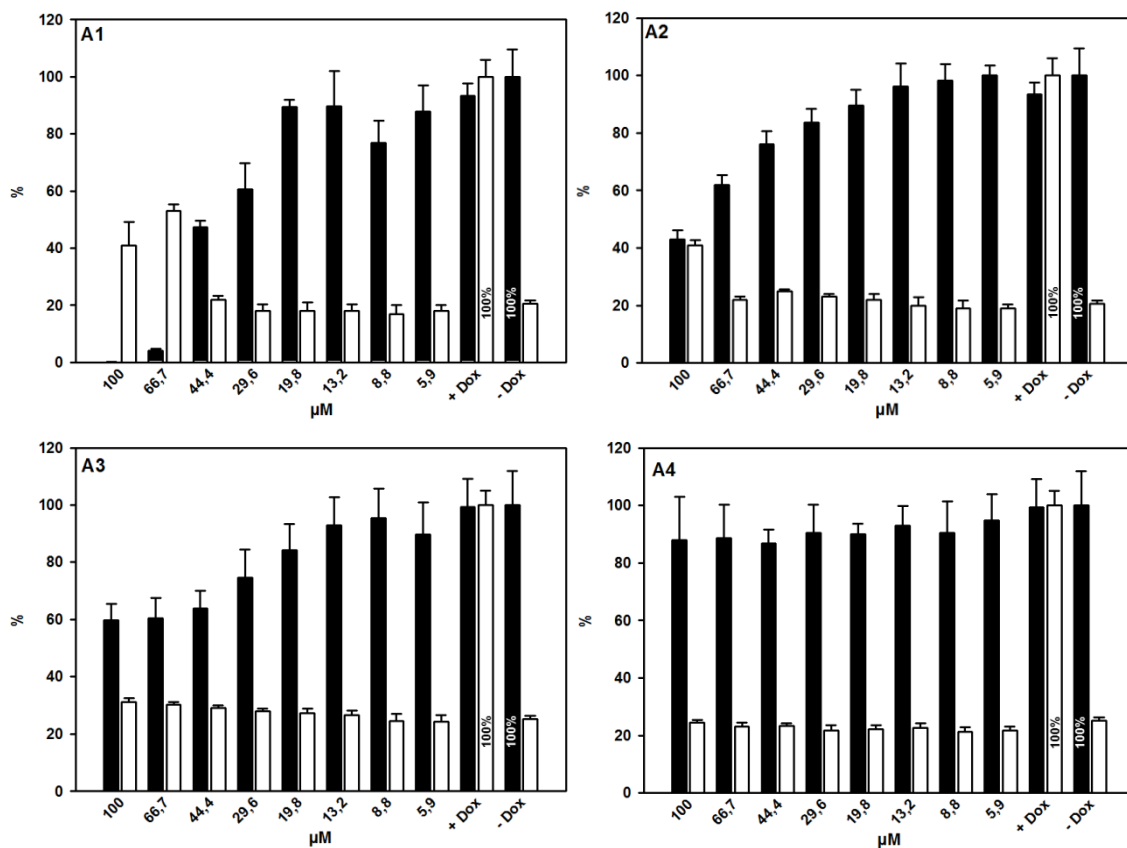
Als Mitglied meines Promotionskomitees als auch für die Bereitstellung der RN-18 Derivate und ElonginC-Vif-Interaktionsinhibitoren möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Tanja Schirmeister bedanken. Ebenso gilt mein Dank Armin Welker, Christoph Menrath und Ferdinand Matz.

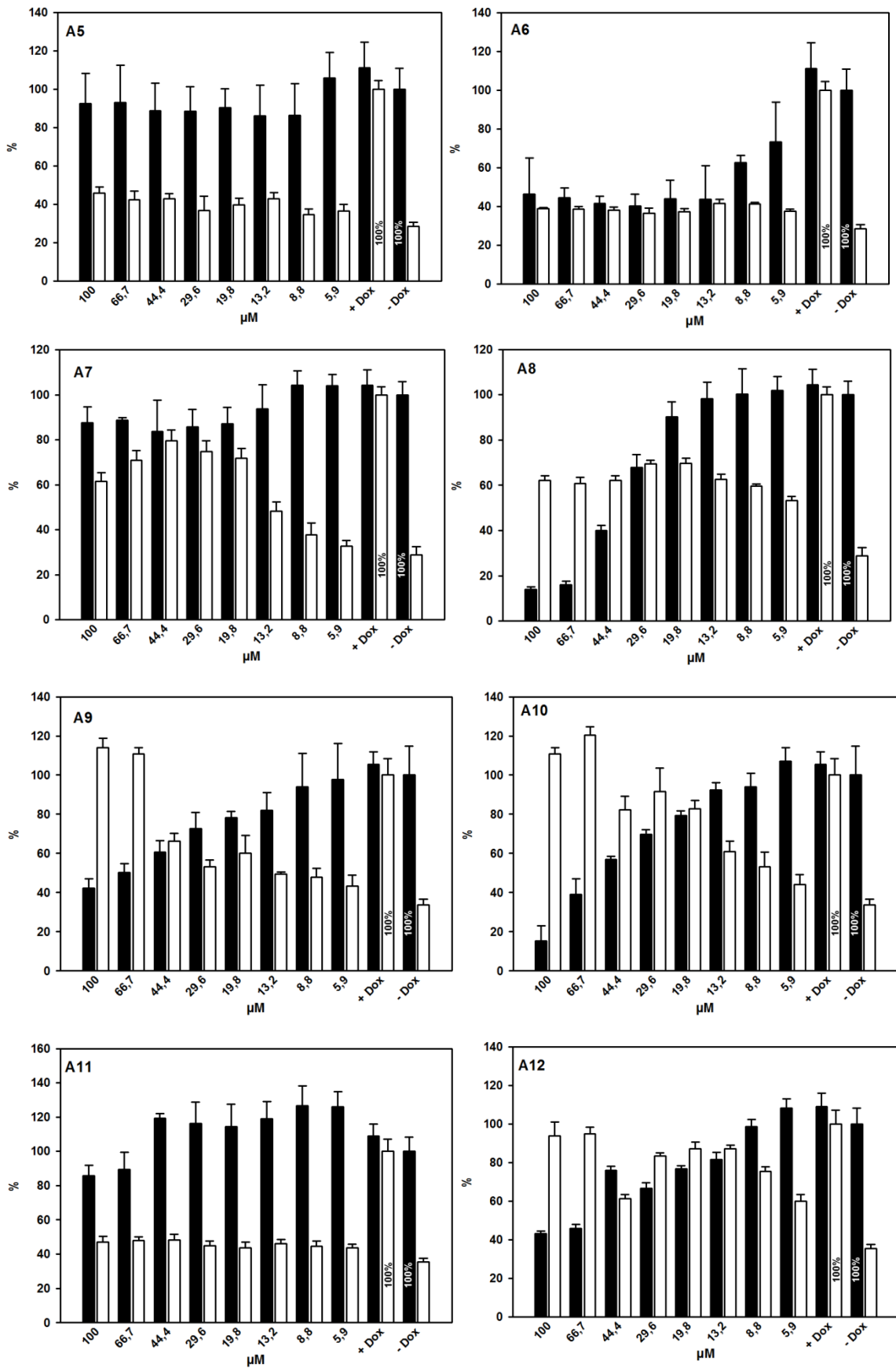
Zum Schluss danke ich ganz besonders meiner Frau Johanna und meinen Söhnen Cord und Flinn dafür, dass sie mir auch in stressigen Situationen den Rücken gestärkt haben und immer für mich da waren.

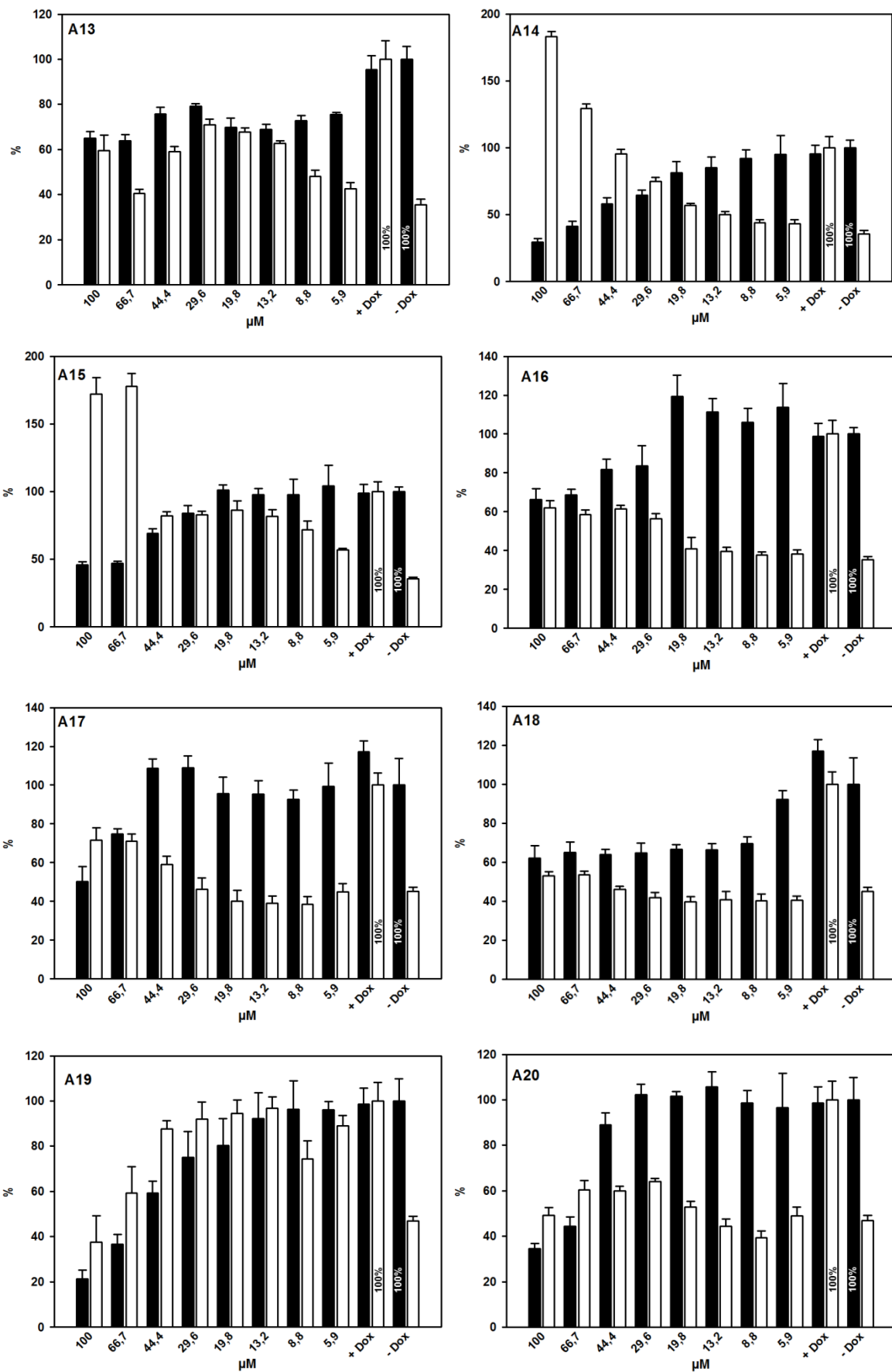
12. Anhang

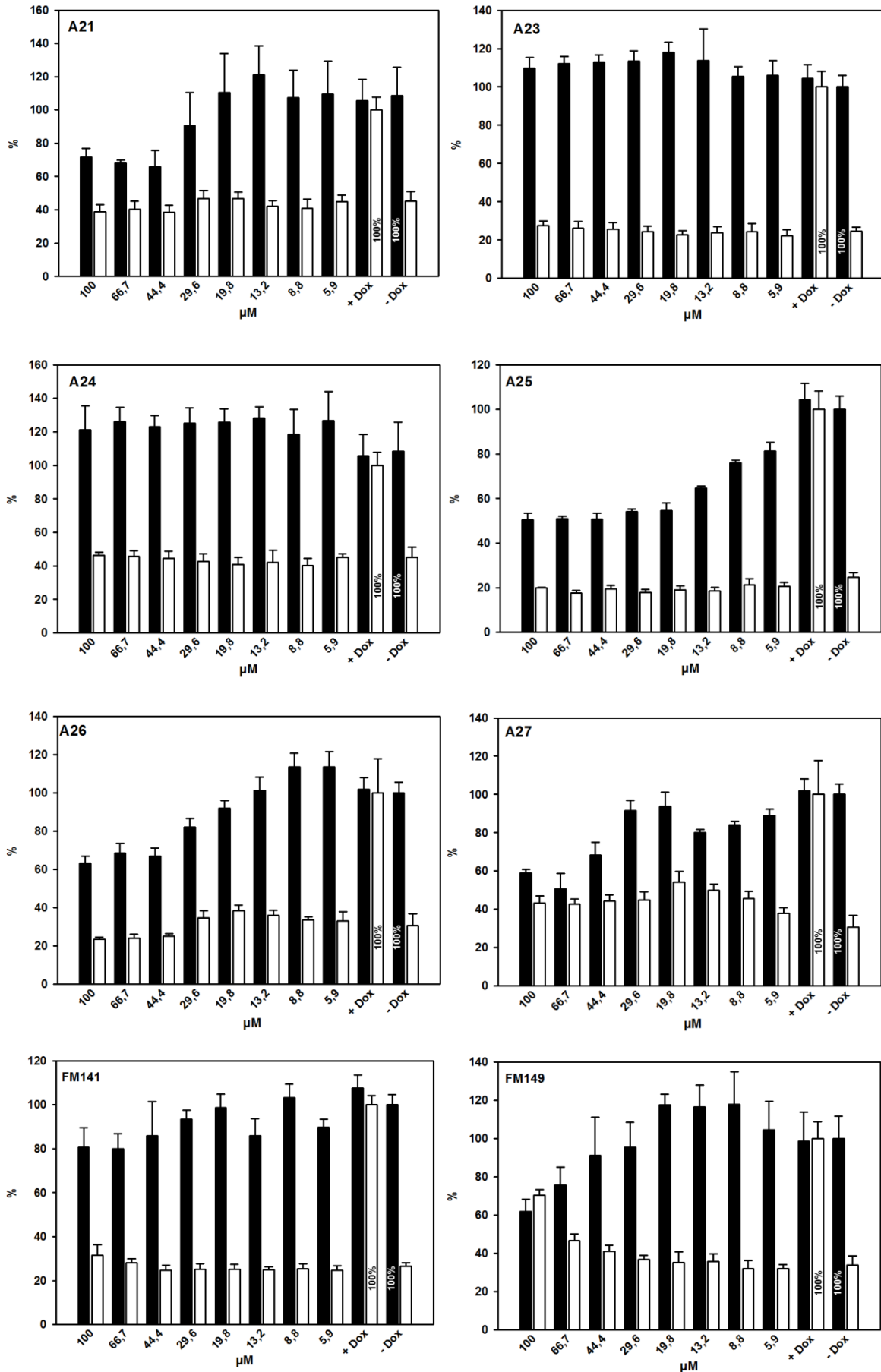
12.1. Analyseergebnisse der Vif-ElonginC-Interaktionsinhibitoren

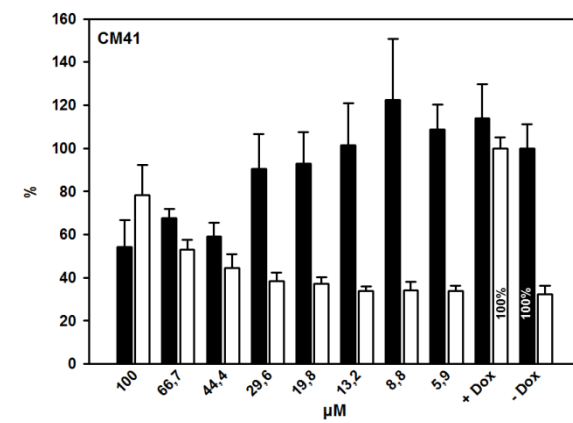
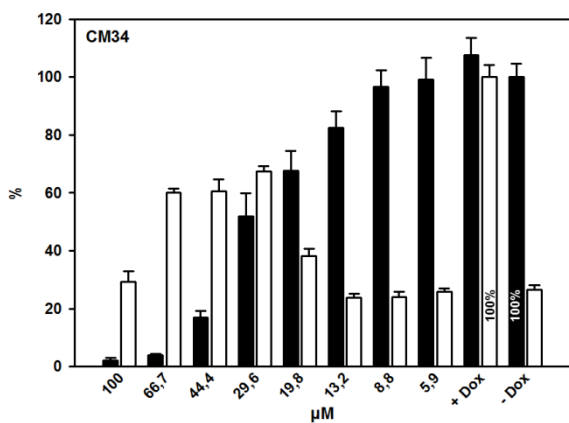
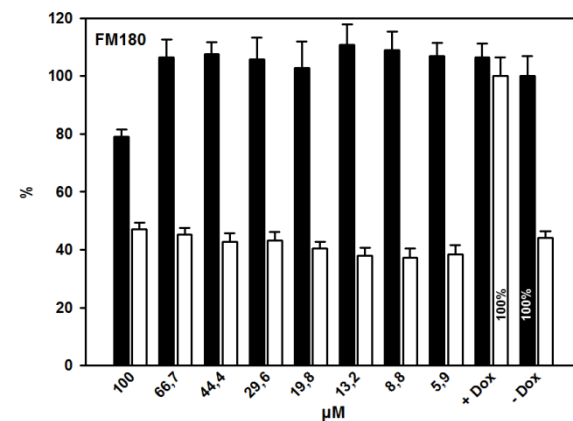
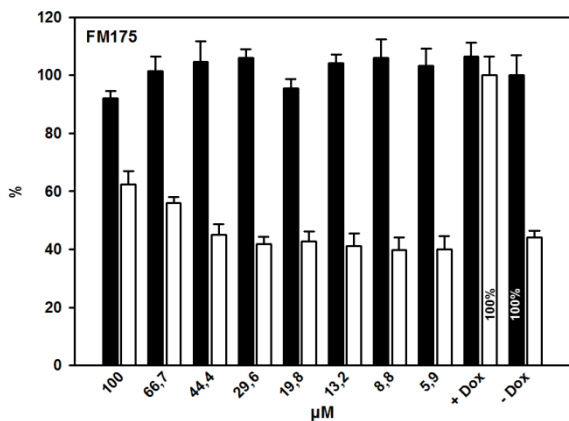
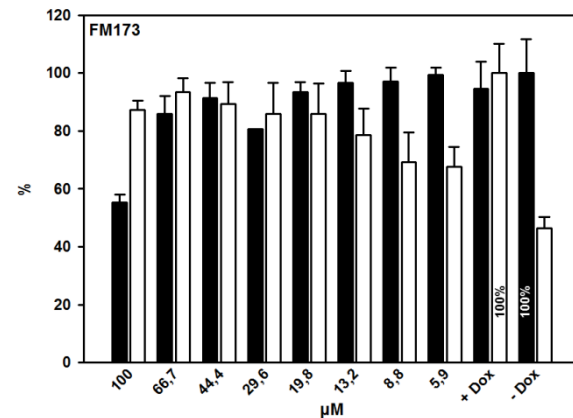
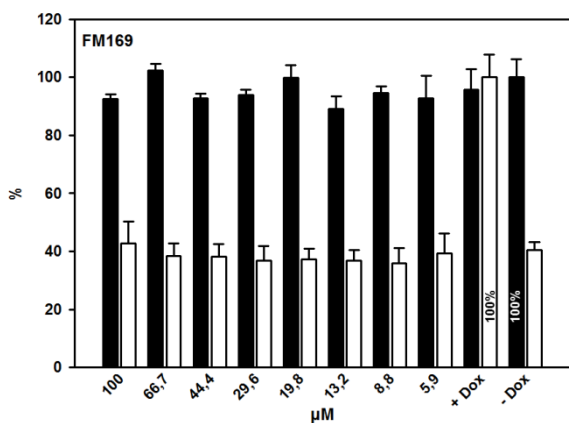
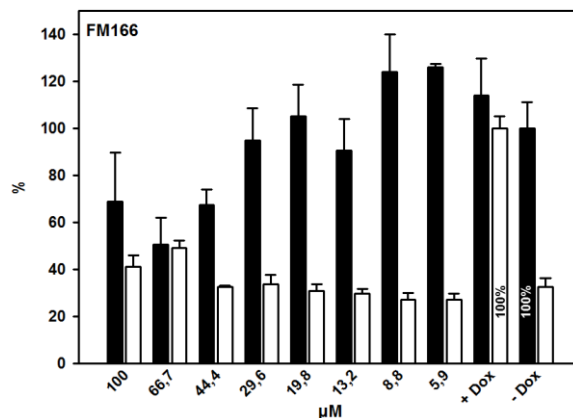
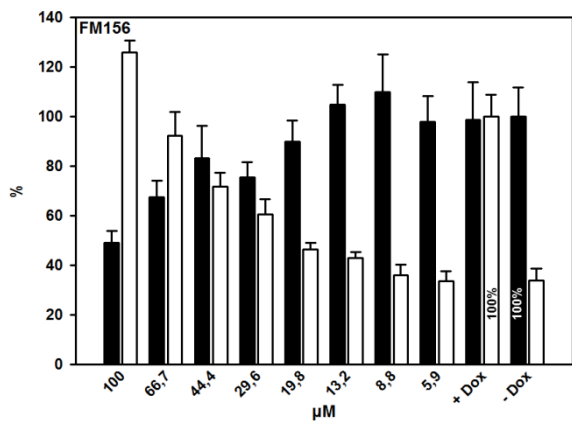
Die Analyse der potentiellen Vif-ElonginC-Interaktionsinhibitoren erfolgte mit dem A3G-Abbauassay. Parallel wurde ein MTT-Assay unter Verwendung der 293T^{Vif} TetOff/EYFP-A3G-Zellen durchgeführt. Zur Durchführung der Analyse siehe Punkt 3.2.10 (MTT-Assay) und 3.2.12. (Substanzscreening im 96-Well Format). Die Substanzbezeichnungen finden sich in jeder Grafik. Balken weiß = Ergebnisse des Substanzscreening mit dem A3G-Abbauassay in % Fluoreszenz, Balken schwarz = Ergebnisse des MTT-Assays in % Viabilität.

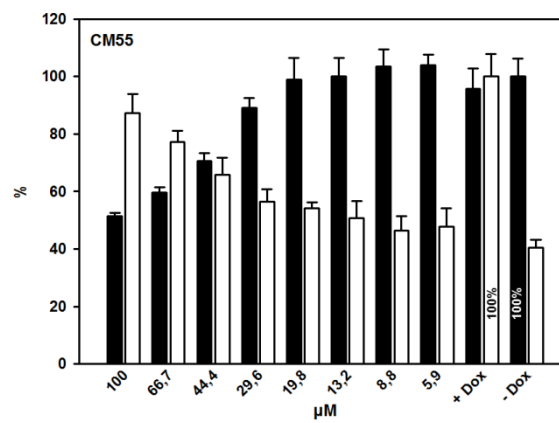
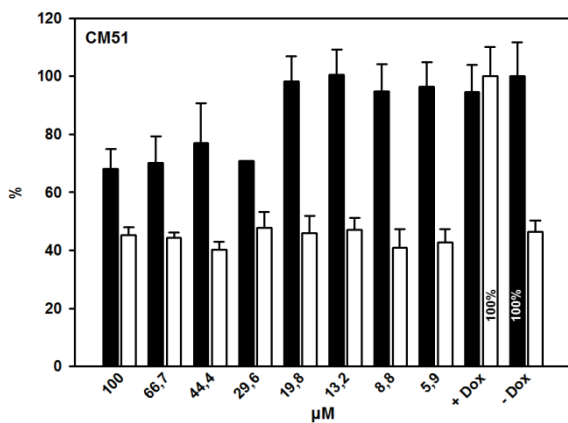
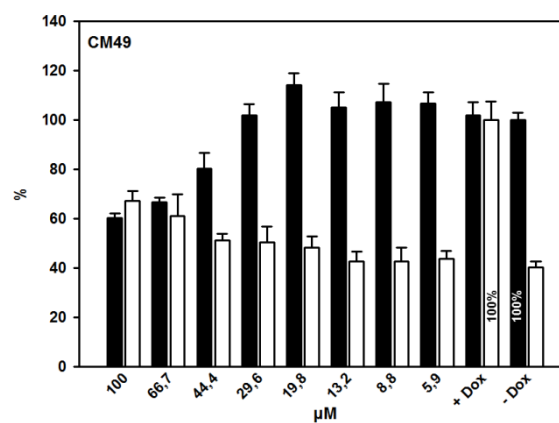
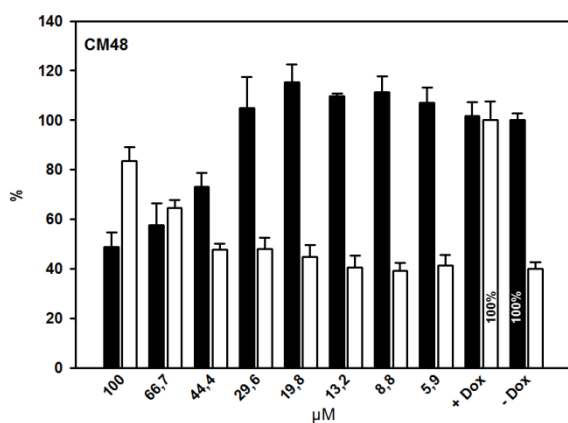
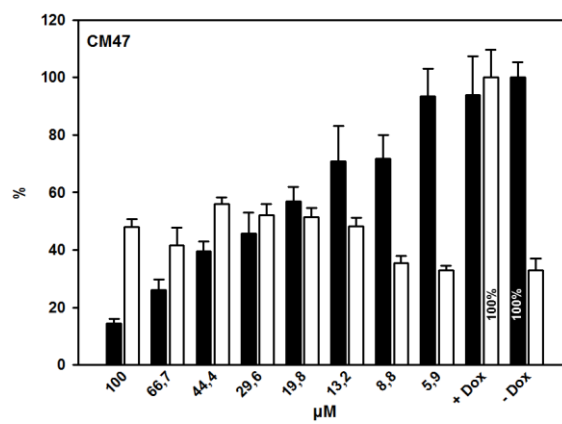
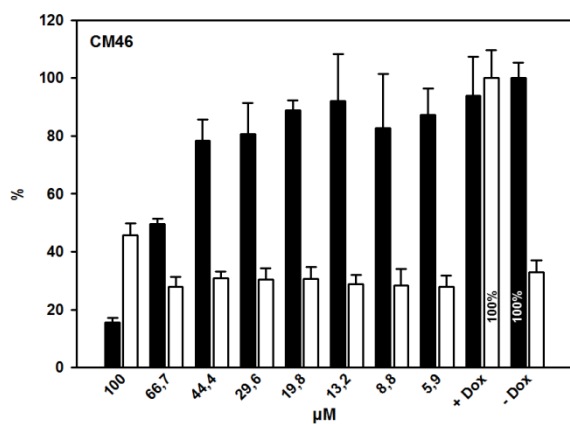












12.2. DNA-Sequenzen

Dargestellt sind die kodierenden DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Fusionskonstrukte sowie die für APOBEC3G, Vif und ElonginC. Es ist jeweils das Start- und Stopp-Codon hervorgehoben.

HIV-1 Vif_{HXBIII} (5' → 3')

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACAC
ATGGAAAAGATTAGTAAAACACCATATGTATATTTCAAGGAAAAGCTAAGGACTGGTTTT
ATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTCAGAAGTACACATCCCAC
GGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGACTG
GCATTTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGAGATATAGCACACAAGTAG
ACCCTGACCTAGCAGACCAACTAATTCATCTGCACTATTTTGTATTGTTTTTCAGAATCT
GCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTGAATATCAAGCAGG
ACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAATAAAAACAAAAC
AGATAAAGCCACCTTTGCCTAGTGTTAGGAAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCC
CAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACAC**TAG**

CVenus-LL-Vif138-192 wt (5' → 3')

ATGGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA
CGGCGGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCG
TGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAAC
GAGAAGCGGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGG
CATGGACGAGCTGTACAAGAGAATTCCTGTCAAAATACCAAACGACCTAAAACAAAAG
TAATGACCGGTCATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAATA
AAACCAAACAGATAAAGCCACCTTTGCCTAGTGTTAGGAAACTGACAGAGGACAGATG
GAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACAC**TAG**

Humanes ElonginC (5' → 3')

ATGGATGGAGAGGAGAAAACCTATGGTGGCTGTGAAGGACCTGATGCCATGTATGTCAA
ATTGATATCATCTGATGGCCATGAATTTATTGTAAAAAGAGAACATGCATTAACATCAG
GCACGATAAAAGCCATGTTGAGTGGCCAGGTCAGTTTGCTGAGAACGAAACCAATGAG
GTCAATTTTAGAGAGATACTTCACATGTGCTATCGAAAGTATGCATGTATTTTACGTA
CAAGGTTTCGCTACACTAACAGCTCCACCGAGATTCTGAATTTCCAATTGCACCTGAAA
TTGCACTGGAACCTGCTGATGGCTGCGAACTTCTTAGATTGT**TAA**

NVenus-GS-EloC wt (5' → 3')

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA
CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCT
ACGGCAAGCTGACCCTGAAGCTGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
ACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCCGCTACCCCGACCACAT
GAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCA
TCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC
ACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT
GGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGC
AGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAATTCGGTGGCGGA
GGTTCAGGTGGCGGAGGTTCAAGGTGGCGGAGGTTCAAGGTGGCGGAGGTTCAAGGTGGCGG
AGGTTCAAGGTGGCGGAGGTTCAACCGGTATGGATGGAGAGGAGAAAACCTATGGTGGCT

GTGAAGGACCTGATGCCATGTATGTCAAATTGATATCATCTGATGGCCATGAATTTATT
 GTAAAAAGAGAACATGCATTAACATCAGGCACGATAAAAGCCATGTTGAGTGGCCAGG
 TCAGTTTGCTGAGAACGAAACCAATGAGGTCAATTTAGAGAGATACCTTCACATGTGC
 TATCGAAAGTATGCATGTATTTTACGTACAAGGTTTCGCTACACTAACAGCTCCACCGAG
 ATTCTGAATCCCAATTGCACCTGAAATTGCACTGGAAGTCTGATGGCTGCGAAGCTT
 CTTAGATTGTTAA

Humanes APOBEC3G (5' → 3')

ATGAAGCCTCACTTCAGAAACACAGTGGAGCGAATGTATCGAGACACATTCTCCTACAA
 CTTTTATAATAGACCCATCCTTTCTCGTCGGAATACCGTCTGGCTGTGCTACGAAGTGA
 AAACAAAGGGTCCCTCAAGGCCCCCTTTGGACGCAAAGATCTTTCGAGGCCAGGTGTAT
 TCCGAACCTAAGTACCACCCAGAGATGAGATTCTTCCACTGGTTCAGCAAGTGGAGGAA
 GCTGCATCGTGACCAGGAGTATGAGGTCACCTGGTACATATCCTGGAGCCCCTGCACAA
 AGTGTACAAGGGATATGGCCACGTTCTGGCCGAGGACCCGAAGTTACCCTGACCATC
 TTCGTTGCCCGCCTCTACTACTTCTGGGACCCAGATTACCAGGAGGCGCTTCGCAGCCT
 GTGTCAGAAAAGAGACGGTCCGCGTGCCACCATGAAGATCATGAATTATGACGAATTC
 AGCACTGTTGGAGCAAGTTCGTGTACAGCCAAAGAGAGCTATTTGAGCCTTGGAATAAT
 CTGCCATAATATATATATTAATGACATCATGCTGGGGGAGATTCTCAGACACTCGAT
 GGATCCACCCACATTCACCTTTCAACTTTAACAATGAACCTTGGGTGAGAGGACGGCATG
 AGACTTACCTGTGTTATGAGGTGGAGCGCATGCACAATGACACCTGGGTCTGCTGAAC
 CAGCGCAGGGGCTTTCTATGCAACCAGGCTCCACATAAACACGGTTTTCCTTGAAGGCCG
 CCATGCAGAGCTGTGCTTCTGGACGTGATTCCCTTTTGGAAAGCTGGACCTGGACCAGG
 ACTACAGGGTTACCTGCTTACCTCCTGGAGCCCCTGCTTACAGCTGTGCCAGGAAATG
 GCTAAATTCATTTCAAAAAACAAACACGTGAGCCTGTGCATCTTCACTGCCCGCATCTA
 TGATGATCAAGGAAGATGTCAGGAGGGGCTGCGCACCCCTGGCCGAGGCTGGGGCCAAAA
 TTTCAATAATGACATACAGTGAATTTAAGCACTGCTGGGACACCTTTGTGGACCACCAG
 GGATGTCCCTTCCAGCCCTGGGATGGACTAGATGAGCACAGCCAAGACCTGAGTGGGAG
 GCTGCGGGCCATTCTCCAGAATCAGGAAAACTGA

EYFP-LL-A3G (5' → 3')

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA
 CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCT
 ACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTCCCTGGCCC
 ACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGTTCGCCCGCTACCCCGACCACAT
 GAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCA
 TCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC
 ACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT
 GGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGC
 AGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTG
 CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGTGCC
 CGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCG
 ATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG
 CTGTACAAGAGAATTCGGCATGCAAAATACCAAACGACCTAAAACAAAAGTAATGAC
 CGGTATGAAGCCTCACTTCAGAAACACAGTGGAGCGAATGTATCGAGACACATTCTCCT
 ACAACTTTTTATAATAGACCCATCCTTTCTCGTCGGAATACCGTCTGGCTGTGCTACGAA
 GTGAAAACAAAGGGTCCCTCAAGGCCCCCTTTGGACGCAAAGATCTTTCGAGGCCAGGT
 GTATTCCGAACCTAAGTACCACCCAGAGATGAGATTCTTCCACTGGTTCAGCAAGTGA
 GGAAGCTGCATCGTGACCAGGAGTATGAGGTCACCTGGTACATATCCTGGAGCCCCTGC
 ACAAGTGTACAAGGGATATGGCCACGTTCTGGCCGAGGACCCGAAGGTTACCCTGAC
 CATCTTTGTTGCCCGCCTCTACTACTTCTGGGACCCAGATTACCAGGAGGCGCTTCGCA
 GCCTGTGTCAGAAAAGAGACGGTCCGCGTGCCACCATGAAGATCATGAATTATGACGAA

TTTCAGCACTGTTGGAGCAAGTTCGTGTACAGCCAAAGAGAGCTATTTGAGCCTTGGAA
TAATCTGCCTAAATATTATATATTACTGCACATCATGCTGGGGGAGATTCTCAGACACT
CGATGGATCCACCCACATTTCACTTTCAACTTTAACAATGAACCTTGGGGTCAGAGGACGG
CATGAGACTTACCTGTGTTATGAGGTGGAGCGCATGCACAATGACACCTGGGTCTCTGCT
GAACCAGCGCAGGGGCTTTCTATGCAACCAGGCTCCACATAAACACGGTTTCCTTGAAG
GCCGCCATGCAGAGCTGTGCTTCTGGACGTGATTCCCTTTTGAAGCTGGACCTGGAC
CAGGACTACAGGGTTACCTGCTTACCTCCTGGAGCCCCTGCTTCAGCTGTGCCCAGGA
AATGGCTAAATTCATTTCAAAAAACAACACGTGAGCCTGTGCATCTTCACTGCCCGCA
TCTATGATGATCAAGGAAGATGTCAGGAGGGGCTGCGCACCCCTGGCCGAGGCTGGGGCC
AAAATTTCAATAATGACATACAGTGAATTTAAGCACTGCTGGGACACCTTTGTGGACCA
CCAGGGATGTCCCTTCCAGCCCTGGGATGGACTAGATGAGCACAGCCAAGACCTGAGTG
GGAGGCTGCGGGCCATTCTCCAGAATCAGGAAAACTGA

ODD(aa401-603)-SBFP (5' → 3')

ATGGGCCCCAGCCGCTGGAGACACAATCATATCTTTAGATTTTGGCAGCAACGACACAGA
AACTGATGACCAGCAACTTGAGGAAGTACCATTATATAATGATGTAATGCTCCCTCAC
CCAACGAAAAATTACAGAATATAAATTTGGCAATGTCTCCATTACCCACCGCTGAAACG
CCAAAGCCACTTCGAAGTAGTGCTGACCCTGCACTCAATCAAGAAGTTGCATTAATAATT
AGAACCAAATCCAGAGTCACTGGAACCTTCTTTTACCATGCCCCAGATTCAGGATCAGA
CACCTAGTCTTCCGATGGAAGCACTAGACAAAGTTCACCTGAGCCTAATAGTCCCAGT
GAATATTGTTTTTATGTGGATAGTGATATGGTCAATGAATTCAGTTGGAATTGGTAGA
AAAATTTTTTGCTGAAGACACAGAAGCAAAGAACCCATTTTCTACTCAGGACACAGATT
TAGACTTGGAGATGTTAGCTCCCTATATCCCAATGGATGATGACTTCCAGTTACGTTCC
TTCGATCAGTTGTCACCATTAGAAAGCAGTTCCGCAAGCCCTGAAAGCGCAAGTCTCA
AAGCACAGTTACAGTATTCCAGACTAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCACCG
GGGTGGTGCCCATCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTG
TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCAC
CACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGAGCCACGGCGTGC
AGTGCTTCGCCCCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATG
CCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC
CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA
TCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTTCAACAGC
CACAAAGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGAT
CCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCC
CCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAG
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTGACCGC
CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

12.3. Lebenslauf