

Identifizierung und Charakterisierung zweier neuer Proteine, die mit dem HIV Rev-Protein interagieren

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

vorgelegt von

Till Treptow

Dezember 2007

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Ruth Brack-Werner

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Datum der mündlichen Prüfung: 10.3.2009

Inhalt

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	Das Humane Immundefizienzvirus HIV.....	7
1.1.1	HIV und AIDS	7
1.1.2	Epidemiologie	7
1.1.3	Natürlicher Krankheitsverlauf.....	8
1.1.4	Systematik von HIV.....	10
1.1.5	Struktur und Aufbau von HIV	11
1.1.6	Replikationszyklus von HIV	13
1.2	Das HIV-1 Rev-Protein.....	16
1.2.1	Funktion des Rev-Proteins	16
1.2.2	Struktur des Rev-Proteins	18
1.2.3	Interaktion zwischen Rev und RRE-haltiger viraler RNA.....	20
1.3	Antivirale Therapien gegen HIV.....	21
1.3.1	HAART („highly active antiretroviral therapy“).....	21
1.3.2	Neue und experimentelle Therapie-Strategien	23
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	28
2	MATERIAL UND METHODEN	29
2.1	Material.....	29
2.1.1	Chemikalien	29
2.1.2	Puffer und Lösungen	30
2.1.3	Medien für Bakterien	33
2.1.4	Medien für humane Zellen	34
2.1.5	Kits.....	34
2.1.6	Enzyme.....	35
2.1.7	Antikörper	35
2.1.8	Plasmide.....	36
2.1.9	Zellen	38
2.1.9.1	Bakterielle Zellen.....	38
2.1.9.2	Humane Zellen	40
2.1.10	Geräte.....	40
2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	41
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	41
2.2.1.1.1	Plasmid-DNA-Mini-Präparation	41
2.2.1.1.2	Plasmid-DNA-Maxi-Präparation.....	42
2.2.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	43
2.2.1.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen und Aufreinigung von PCR-Produkten	43
2.2.1.4	Ligationen.....	44
2.2.1.5	Dephosphorylierung von DNA	44
2.2.1.6	Klonieren mit dem BD In-Fusion PCR Cloning Kit	45
2.2.1.7	Einfrieren von Bakterien	46
2.2.1.8	Transformationen von Bakterienzellen mit Plasmiden	47
2.2.1.8.1	Elektroporation.....	47
2.2.1.8.2	Transformation chemisch kompetenter Zellen	47

2.2.1.9	Herstellen kompetenter Bakterien	48
2.2.1.9.1	Herstellen elektrokompetenter Bakterien	49
2.2.1.9.2	Herstellen chemisch kompetenter Bakterien (CaCl ₂)	49
2.2.1.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
2.2.1.11	Restriktionsverdau.....	51
2.2.1.12	Gelelektrophorese von DNA	51
2.2.2	Techniken zur Analyse von Proteinen	52
2.2.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen	52
2.2.2.2	Westernblot.....	52
2.2.2.3	Nachweis von Proteinen durch Antikörper.....	53
2.2.2.4	Entfernen gebundener Antikörper von der Nitrozellulose Membran (Strippen).....	53
2.2.3	Zellkulturtechniken.....	54
2.2.3.1	Kultivierung und Aussaat humaner Zellen	54
2.2.3.2	Transfektion von HeLa-Zellen mit dem FuGENE 6 Transfektionsreagenz	54
2.2.4	Mikroskopie	55
2.2.5	β-Galactosidase-Assay	55
2.2.6	Co-Immunopräzipitation	57
2.2.7	Zytotoxizitäts-Test.....	57
2.2.8	BLAST-Techniken zur Datenbankanalyse von DNA- und Proteinsequenzen.....	58
2.3	Das bakterielle Zwei-Hybrid-System.....	59
2.3.1	Das BMI-System.....	61
2.3.2	Das BMII-System.....	62
2.3.3	Die humane fötale cDNA-Bibliothek aus Gehirn	62
2.3.4	Ernte der cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn	64
2.4	Computerprogramme	64
2.5	DNA-Sequenzierungen	65
3	ERGEBNISSE	66
3.1	Identifizierung neuer Rev-interagierender Faktoren mit Hilfe eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems.....	68
3.1.1	Etablierung der Rev-Rev-Positivkontrolle für das bakterielle Zwei-Hybrid-System	68
3.1.2	Ermittlung der besten Bedingungen für das Library-Screening mit BMII-Zellen	71
3.1.3	Screening einer humanen fötalen cDNA-Bibliothek aus Gehirn auf Rev-Interaktoren	75
3.2	Charakterisierung der neu identifizierten Rev-Interaktoren.....	83
3.2.1	Charakterisierung in bakteriellen Zellen	83
3.2.1.1	Bestimmung der relativen Interaktionsstärken der neu identifizierten Faktoren mit Rev im β-Galactosidase-Assay	83
3.2.1.2	Charakterisierung der interagierenden Domänen in Rev	86
3.2.1.3	Charakterisierung der Rev-interagierenden Domänen in B1-1	89
3.2.1.4	Charakterisierung der Rev-interagierenden Domänen in VPS 28.....	92
3.2.1.5	Überprüfung der Fähigkeit zur Dimer-Bildung von B1-1	94
3.2.2	Charakterisierung in humanen Zellen	96
3.2.2.1	Co-Lokalisation der neu identifizierten Interaktoren mit Rev	96
3.2.2.2	Co-Immunopräzipitation der neu identifizierten Interaktoren mit Rev.....	100
3.2.2.3	Untersuchung der Zytotoxizität der neu identifizierten Faktoren in humanen Zellen	104

4	DISKUSSION	108
4.1	Diskussion der Zielsetzung.....	109
4.2	Verwendung eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems als Mittel zur Identifizierung Rev-interagierender Faktoren	111
4.2.1	Zwei-Hybrid-System	111
4.2.2	Bakterielles System	112
4.2.3	Humane fötale cDNA-Bibliothek aus Gehirn	113
4.3	Kritik des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems BacterioMatch von Stratagene	113
4.3.1	Vorteile des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems BacterioMatch von Stratagene	114
4.3.2	Nachteile des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems BacterioMatch von Stratagene	116
4.4	Die neu identifizierten Rev-interagierenden Proteine.....	121
4.4.1	B1-1 und GST A4	121
4.4.1.1	Interaktion von B1-1 und GST A4 mit Rev.....	121
4.4.1.2	Zur Untersuchung der Interaktion verschiedener Domänen von B1-1 / GST A4 mit Rev.....	125
4.4.1.3	Zur Untersuchung der Fähigkeit von B1-1 zur Bildung von Heterodimeren mit GST A4.....	127
4.4.2	B2-92 und VPS 28	128
4.4.2.1	Interaktion von B2-92 und VPS 28 mit Rev	129
4.4.2.2	Zur Untersuchung der Interaktion verschiedener Domänen von VPS 28 mit Rev	129
4.4.2.2.1	Mögliche Bedeutung der Interaktion zwischen VPS 28 und Rev in einer HIV-infizierten Zelle.....	130
4.4.2.2.2	Mögliche therapeutische Bedeutung von VPS 28 Fragmenten	133
4.4.3	Zytotoxizität von B1-1 und B2-92	135
4.5	Zusammenfassung	138
4.6	Ausblick.....	139
5	ANHANG.....	I
5.1	Informationen zur Glutathion-S-Transferase A4 (GST A4) aus Literatur und Internet-Datenbanken	I
5.1.1	Glutathion-S-Transferasen (GSTs) allgemein.....	I
5.1.2	Klassifizierung der Glutathion-S-Transferasen	I
5.1.3	Glutathion-S-Transferase A4 (GST A4): Allgemeines.....	II
5.1.4	Genomische Organisation von GST A4	III
5.1.5	Expressionsprofil von GST A4	IV
5.1.6	Struktur von GST A4	VI
5.1.7	Bindestellen für elektrophile Substrate (H-site bzw. HTA) in GST A4	VII
5.1.8	Aktivierung des Glutathions bei GST A4	IX
5.1.9	Dimerisierung	IX
5.1.10	Ligandin-Funktion von GST A4	X
5.2	Informationen zum Vacuolar Protein Sorting 28 (VPS 28) aus Literatur und Internet-Datenbanken	XI
5.2.1	Allgemeines.....	XI
5.2.2	Funktion der ESCRT-Protein-Komplexe.....	XIII
5.2.3	Struktur und Funktion von VPS 28 bzw. des ESCRT-I Komplexes.....	XIV
5.2.4	Kristallstruktur des ESCRT-I Komplexes und von VPS 28	XVII
5.2.5	Rolle der ESCRT Komplexe beim Budding von HIV (und anderen Retroviren)	XVIII
5.2.6	Genomische Organisation und Expressionsprofil von VPS 28	XX

5.3	Abkürzungen	XXII
5.4	BLAST Analyse	XXIII
5.5	Verzeichnis der Abbildungen.....	XXVIII
5.6	Verzeichnis der Tabellen	XXX
5.7	Literatur.....	XXX

1 Einleitung

1.1 Das Humane Immundefizienzvirus HIV

1.1.1 HIV und AIDS

HIV wurde erstmals im Jahre 1983 unabhängig voneinander von Robert C. Gallo und Luc Montagnier isoliert und von Gallo als HTLV-III (human T-cell leukemia virus III) und von Montagnier als LAV-I (lymphadenopathy-associated virus I) beschrieben (Gallo et al. 1983 bzw. Barre-Sinoussi et al. 1983). Wenig später wurde HIV als ätiologisches Agens der erworbenen Immunschwäche AIDS erkannt, siehe z.B. Levy et al. (1984); Gallo et al. (1984); Broder und Gallo (1984).

1.1.2 Epidemiologie

Zur Zeit sind weltweit ca. 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Seit Beginn der AIDS-Epidemie sind insgesamt ca. 25 Millionen Menschen an AIDS gestorben. Im Jahre 2005 haben sich weltweit ca. 5 Millionen Menschen neu mit HIV infiziert (UNAIDS; Robert Koch Institut).

Der Anteil der HIV-Patienten, die eine HAART (highly active antiretroviral therapy) Behandlung (siehe 1.3.1) bekommen, hat auch außerhalb der reichen Industrieländer zugenommen. So bekommen mittlerweile über 80 % der behandlungsbedürftigen Patienten z.B. in Argentinien, Brasilien, Chile oder Kuba eine HAART Behandlung. Allerdings ist die Behandlungssituation in den ärmeren Ländern Lateinamerikas, in Teilen Osteuropa, den meisten asiatischen Ländern und in fast allen Ländern Afrikas sehr schlecht.

Afrika ist mit ca. 26 Millionen HIV-infizierten Menschen der am stärksten betroffene Kontinent. In Südafrika hat sich HIV-Epidemie innerhalb von 10 Jahren von einer Prävalenz von unter 1 % 1990 auf ca. 25 % ausgebreitet.

1.1.3 Natürlicher Krankheitsverlauf

Ohne HAART Therapie (siehe 1.3.1) lässt sich der Krankheitsverlauf nach der HIV-Infektion in die folgenden Phasen einteilen. Zunächst kann bald nach der Infektion ein akutes HIV-Syndrom auftreten, das phänomenologisch einem grippalen Infekt ähnelt und in der Regel nach ca. 4 Wochen abklingt (siehe Tabelle 1, Gruppe I). Dann folgt normalerweise eine Periode von mehreren Jahren einer klinisch asymptomatischen Phase (siehe Tabelle 1, Gruppe II). Danach können Erkrankungen auftreten, die ursächlich mit der HIV-Infektion zusammenhängen und dementsprechend mit einer Beeinträchtigung der zellulären Immunität einhergehen, aber noch nicht AIDS definieren (siehe Tabelle 1, Gruppe III). Schließlich treten dann im Median 12 Jahre nach der HIV-Infektion AIDS-definierende Erkrankungen auf (Weber 2001) (siehe Tabelle 1, Gruppe IV – in mehrere Untergruppen unterteilt). Ohne HAART führen diese nach individuell unterschiedlich langer Zeit zum Tod.

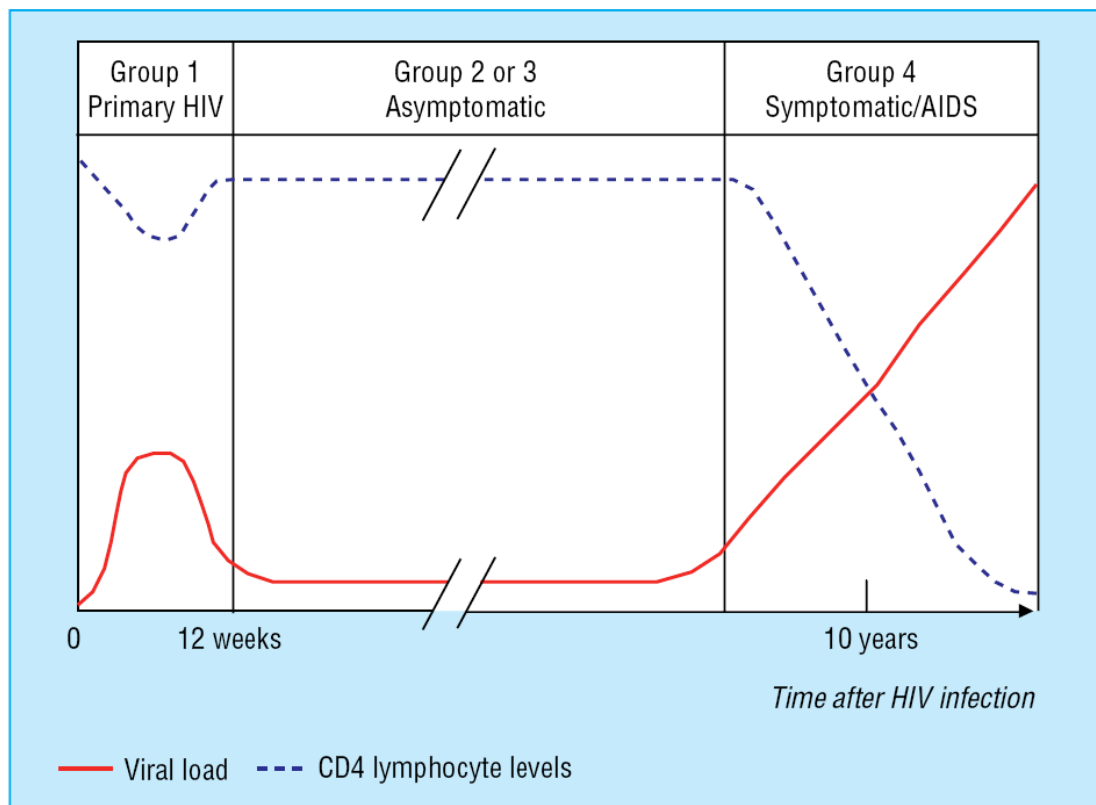
Ein wichtiger Parameter bei HIV-infizierten Patienten ist die Viruslast, die als Zahl der HIV RNA-Kopien pro ml Blut definiert ist. Ein zweiter wichtiger Parameter ist die Anzahl der CD4-positiven T-Lymphozyten pro μl Blut, siehe Abbildung 1. Beim akuten HIV-Syndrom kurz nach der HIV-Infektion steigt die Viruslast zunächst sehr stark an. Die Zahl der CD4-Zellen nimmt parallel dazu stark ab und steigt nach einigen Monaten langsam wieder an, wobei sie in der Regel fast wieder den Ausgangswert erreicht. 4 bis 6 Wochen nach der Infektion sind die ersten Antikörper nachweisbar, parallel dazu nimmt die Viruslast deutlich ab und bleibt in der Regel jahrelang ungefähr stabil. Dieser Wert der Viruslast, der individuell stark variieren kann, wird als „viraler setpoint“ definiert. Der virale setpoint hat prognostischen Wert, da die CD4-Zellzahl in der Folgezeit um so stärker abfällt, je höher der virale setpoint ist. Daher ist eine Strategie bei der Behandlung der akuten HIV-Infektion, den viralen setpoint so weit wie möglich zu senken.

Zu den AIDS-definierenden Erkrankungen zählen opportunistische virale, bakterielle, Pilz- oder Parasiten-bedingte Infektionen, das Kaposi-Sarkom, maligne Lymphome, die HIV-Enzephalopathie und das Wasting-Syndrom. Diese treten aufgrund des Immundefekts bei Absinken der CD4-Zellen unter $200/\mu\text{l}$ auf. Bei einem weiteren Absinken der CD4-Zellen unter $100/\mu\text{l}$ können besonders schwere AIDS-Erkrankungen auftreten, wie z.B. die CMV-Retinitis. Parallel zum Absinken der CD4-Zellzahl steigt bei Patienten ohne HAART die Viruslast an.

Tabelle 1: Klassifizierung der klinischen Phasen einer HIV-Infektion nach den Richtlinien des CDC 1992 der USA. Vgl. Abbildung 1. Aus Mindel und Tenant-Flowers (2001).

Summary of CDC 1992 classification system for HIV disease

Group I	Primary HIV
Group II	Asymptomatic infection
Group III	Persistent generalised lymphadenopathy
Group IV	Symptomatic infection
Group IVA	HIV wasting syndrome (AIDS) and constitutional disease
Group IVB	HIV encephalopathy (AIDS) and neurological disease
Group IVC1	Major opportunistic infections specified as AIDS defining
Group IVC2	Minor opportunistic infections
Group IVD	Cancers specified as AIDS defining
Group IVE	Other conditions



Association between virological, immunological, and clinical events and time course of HIV infection

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Verlaufs einer HIV-Infektion. Aus Mindel und Tenant-Flowers (2001).

1.1.4 Systematik von HIV

HIV-Isolate aus Menschen werden in die beiden Typen HIV-1 und HIV-2 eingeteilt. Weltweit ist HIV-1 vorherrschend, wohingegen das Vorkommen von HIV-2 auf einige Regionen in West- und Zentralafrika beschränkt ist (Guyader et al. 1987).

HIV und das Primaten infizierende SIV (simian immunodeficiency virus) sind genetisch verwandte Mitglieder des Genus der Lentiviren und gehören damit der Familie der Retroviridae an. Das Genom dieser Viren ist charakterisiert durch das Vorhandensein der Strukturgene *gag*, *pol* und *env* und weiterer zusätzlicher Gene. Das Virusgenom besteht aus zwei identischen Kopien einer einzelsträngigen RNA. Es wird angenommen, daß die Ursprünge von HIV-1 und HIV-2 in zoonotischen Übertragungen von SIV in Primaten auf den Menschen liegen (Gojobori et al. 1990; Hahn et al. 2000). So weist HIV-1 eine große Sequenzhomologie mit SIV_{CPZ} aus dem Schimpansen *Pan troglodytes* auf (Gao et al. 1999). HIV-2 dagegen stammt vermutlich von SIV_{SMM} des Mangabenaffen *Cercocebus atys* ab (Hirsch et al. 1989).

HIV-1 wird in die drei Gruppen M („major“), O („outlier“) und N („non M/non O“ bzw. „new“) eingeteilt. Es wird angenommen, daß der Schimpanse *Pan t. troglodytes* das primäre Reservoir für HIV-1 darstellt und die HIV-1 Gruppen M, N und O aus drei unabhängigen zoonotischen Übertragungen von SIV_{CPZ} auf den Menschen entstanden sind (Gao et al. 1999). Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, daß HIV-1 Gruppe O und SIV_{gor} aus dem wilden Gorilla eine sehr große Sequenzhomologie aufweisen. Es ist daher möglich, daß Schimpansen entweder Viren, ähnlich der HIV-1 Gruppe O, auf den Menschen und Gorilla unabhängig übertragen haben oder erst auf den Gorilla und dieser dann auf den Menschen (Van Heuverswyn et al. 2006).

Die HIV-1 Gruppe M repräsentiert ca. 95 % aller bekannten kompletten HIV-1 Genomsequenzen, ist weltweit verbreitet und verantwortlich für die globale AIDS Pandemie (McCutchan 2006). Die Gruppe M wird weiter in 9 Subtypen oder „clades“ unterteilt, die mit den Buchstaben A - D, F - H, J und K bezeichnet werden (Robertson et al. 2000). Diese Klassifizierung wurde ursprünglich anhand der *env* Sequenzen vorgenommen, kann aber auf alle Regionen des Genoms angewendet werden. Die genetische Variation innerhalb eines Subtyps beträgt 15 bis 20 %, zwischen den Subtypen jedoch ca. 25 bis 35 % (Hemelaar et al. 2006). Daneben haben Genomsequenzierungen ergeben, daß Rekombinationen zwischen verschiedenen Subtypen vorkommen können. Diese werden als CRF („circulating recombinant form“) bezeichnet (Robertson et al. 2000). Es wird

vermutet, daß diese CRFs entstanden sind, indem ein Individuum von mindestens zwei unterschiedlichen Subtypen infiziert wurde. Bisher wurden 19 CRFs identifiziert (Hemelaar et al. 2006). In Westeuropa, sowie in Amerika und Australien ist Subtyp B vorherrschend. Subtyp C hingegen ist weltweit für mehr als 50 % aller Infektionen verantwortlich, wobei dieser Subtyp v.a. in Süd- und Ostafrika und in Indien vorherrschend ist (McCutchan 2006; Hemelaar et al. 2006).

1.1.5 Struktur und Aufbau von HIV

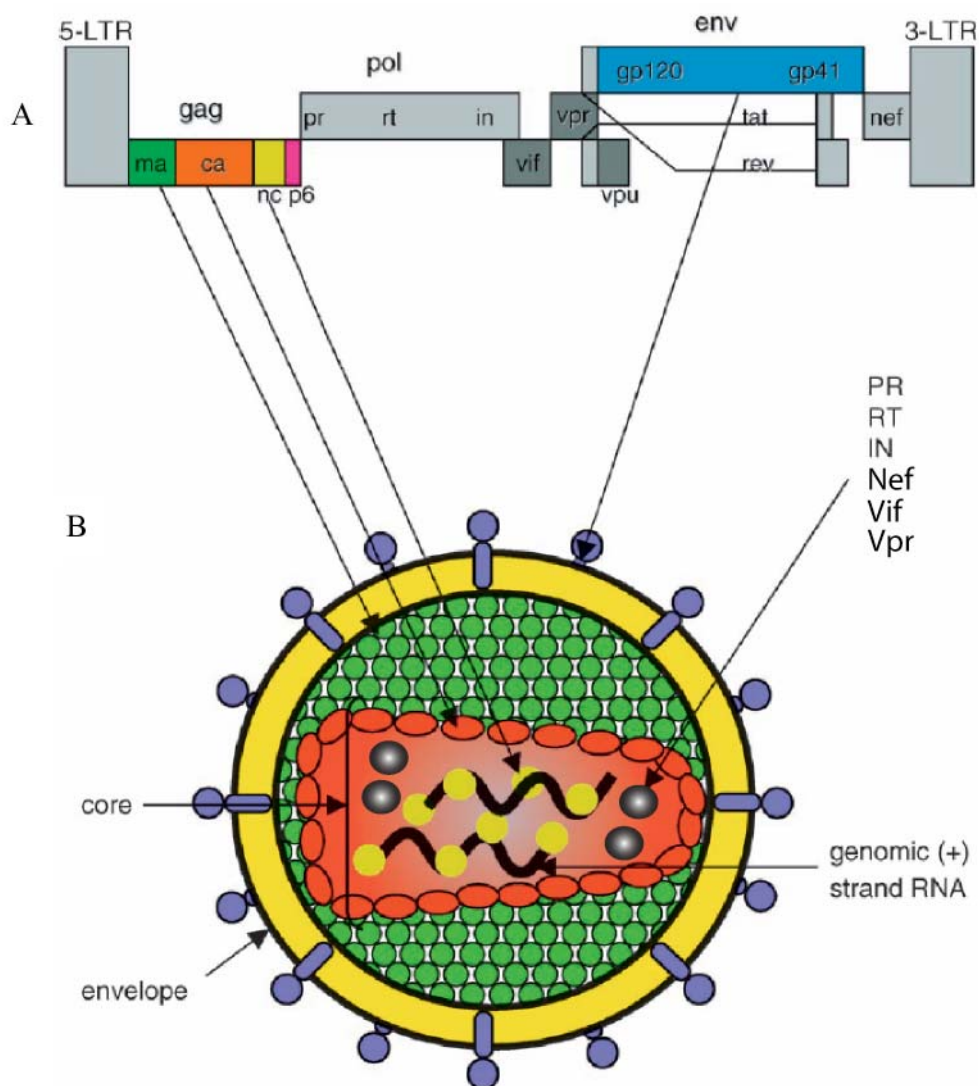


Abbildung 2: Organisation des proviralen Genoms von HIV-1 (A) und Organisation des HIV Virus Partikels (B). Erläuterungen siehe Text. Aus Scarlata und Carter (2003), verändert.

Der Durchmesser eines HIV-Partikels beträgt ca. 110 nm. Das HIV-Partikel (siehe Abbildung 2, B) ist von einer Lipoproteinhülle umgeben („envelope“), in der ca.

73 Env-Glykoproteinkomplexe pro Partikel sitzen, die jeweils aus einem externen Anteil (gp120, SU) und einem Transmembranprotein (gp41, TM) bestehen (Zhu et al. 2006). Daneben enthält die Lipidhülle verschiedene Proteine, wie z.B. HLA Klasse-I und -II Moleküle und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-I. Diese Wirtsproteine stammen aus der Zellmembran der Wirtszelle, aus der das HIV-Viruspartikel ausgeknospt ist (Kolegraff et al. 2006). An der Innenseite der Virushülle ist das p17-Matrixprotein (MA) verankert (Bukrinskaya 2007). Im Zentrum liegt das Capsid, das als konische Struktur von Capsid-Proteinen (p24, CA) gebildet wird (Adamson und Jones 2004). Darin befinden sich zwei identische Kopien der viralen genomischen RNA, die an Nucleocapsidproteine (p7, NC) gebunden sind. Außerdem sind im Capsid noch die viralen Enzyme Protease (PR), Integrase (IN) und Reverse Transkriptase (RT), sowie die viralen akzessorischen Proteine Nef, Vif und Vpr enthalten. Im reifen Viruspartikel konnten die viralen Proteine Rev, Tat und Vpu bisher nicht nachgewiesen werden, vgl. 4.4.2.2.1 (Frankel und Young 1998; Turner und Summers 1999).

Das HIV-1 Genom hat eine Länge von ca. 9,2 kb und liegt als Plus-Strang RNA vor (siehe Abbildung 2, A). Es enthält neun offene Leserahmen (ORF), die für insgesamt 15 Proteine kodieren. Nach der Integration in das Wirtsgenom ist das HIV-Genom von LTRs („long terminal repeats“) flankiert. Die 5'-LTR fungiert als viraler Promotor, die 3'-LTR als Terminator der Transkription.

Das gag Gen kodiert für das Vorläuferprotein p55, aus dem das Matrixprotein p17, das Capsidprotein p24, das Nucleocapsidprotein p7 und das Protein p6 herausgeschnitten wird. Die viralen Enzyme werden vom *pol*-Gen kodiert, indem zunächst ein Gag-Pol-Vorläuferproteins synthetisiert wird, aus dem der Komplex aus Reverser Transkriptase/Ribonuclease H p51/p66, die Integrase p32 und die Protease p10 herausgeschnitten werden. Die Membranproteine werden vom *env*-Gen kodiert. Dabei wird das Vorläuferprotein gp160 synthetisiert, das in das Oberflächen-Glykoprotein gp120 und das transmembrane Glykoprotein gp41 gespalten wird (Tang et al. 1999; Cimorelli und Darlix 2002).

Darüber hinaus werden die regulatorischen Proteine Tat und Rev sowie das akzessorische Protein Nef von vollständig gespleißten viralen Transkripten synthetisiert. Die akzessorischen Proteine Vif, Vpu und Vpr werden wie Env, Gag und Gag-Pol Vorläuferproteine von unvollständig gespleißten viralen Transkripten in der späten Phase der HIV-Infektion synthetisiert. Das HIV Rev-Protein ist verantwortlich dafür, daß diese Transkripte nicht vollständig gespleißt werden, siehe 1.2 und z.B. Cullen (1998).

1.1.6 Replikationszyklus von HIV

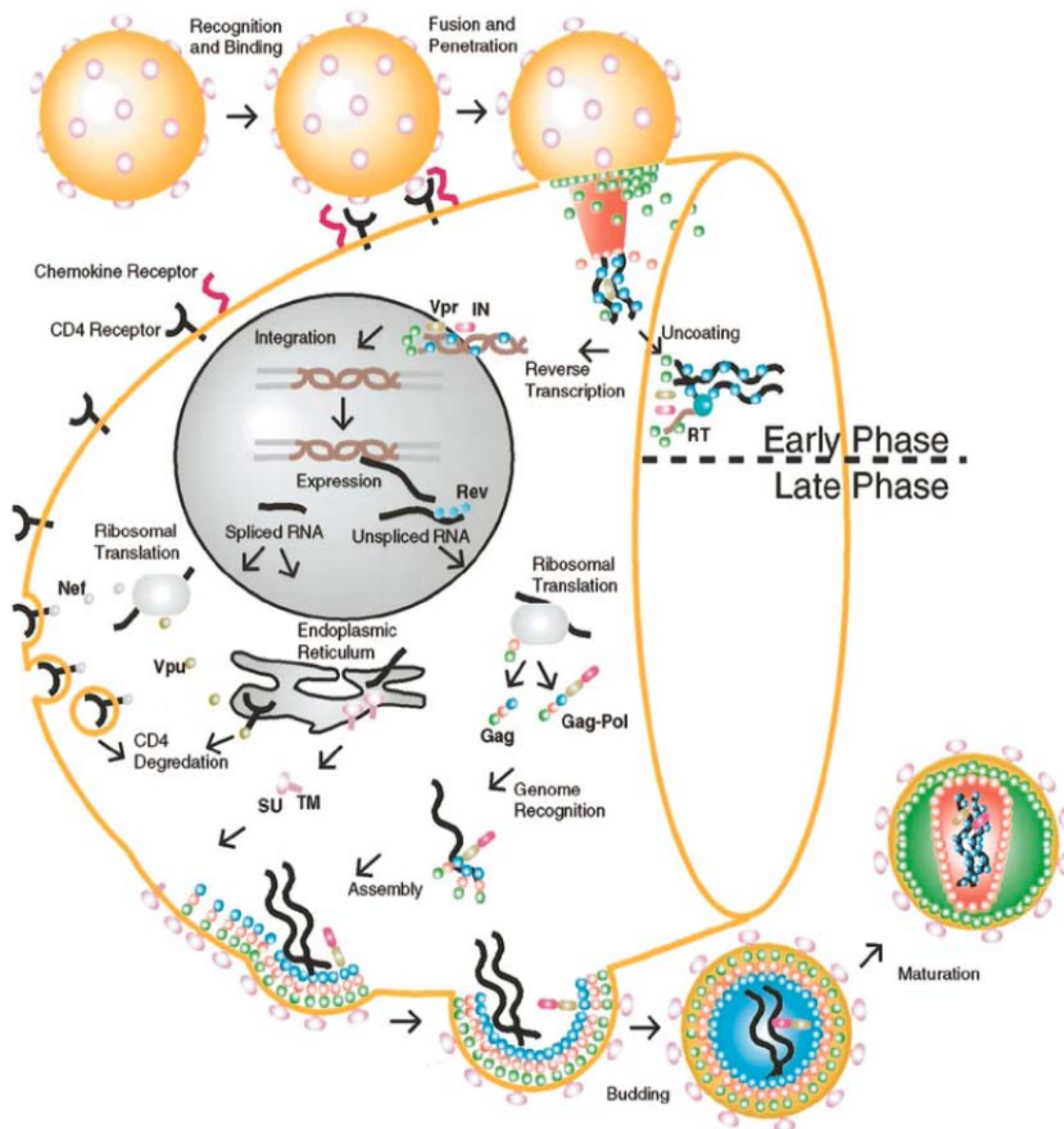


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV. Erläuterungen siehe Text. Aus Turner und Summers (1999).

Wichtige Schritte der Replikation von HIV-1 werden im folgenden beschrieben, vgl. Abbildung 3.

Als primärer Rezeptor für HIV fungiert das Glykoprotein CD4, das sich auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, Makrophagen und Monocyten, Eosinophilen, Dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des ZNS befindet. Das Oberflächen-Glykoprotein gp120 von HIV bindet CD4. Für eine effiziente Infektion der Zelle sind jedoch zusätzlich Corezeptoren erforderlich. CCR5 ist notwendiger Corezeptor monozytotroper (M-troper) HIV-Isolate (Deng et al. 1996; Dragic et al. 1996).

Menschen mit einem Defekt im Gen für CCR5 sind weitgehend resistent gegenüber HIV-Infektionen (Liu et al. 1996). Die wenigen Menschen mit Deletion im CCR5-Gen, die sich trotzdem mit HIV infizierten, wurden durch T-Zell-trope (T-trope) Viren infiziert (Biti et al. 1997). Für T-trope Viren ist der Chemokinrezeptor CXCR4 der Corezeptor (Feng et al. 1996). Einige (Labor-) Isolate von HIV können Zellen auch CD4-unabhängig infizieren.

Durch die Bindung an CD4 erfährt das gp120 Protein von HIV eine Konformationsänderung, so daß es mit hoher Affinität die entsprechenden Chemokinrezeptoren binden kann. Der transmembrane Anteil des gp160 Protein, das gp41 Protein, erfährt ebenfalls eine Konformationsänderung, was dazu führt, daß das hydrophobe aminoternale Ende von gp41 in die Membran der Wirtszelle inseriert. Dadurch wird die Fusion der Membranen zwischen Virus und Wirtszelle eingeleitet (Chan et al. 1997).

Das HIV Matrix-Protein (MA) wird anschließend durch die zelluläre Kinase MAPK (mitogen-activated protein kinase) phosphoryliert, was das Ablösen des Komplexes aus MA und Reverser Transkriptase von der Zellmembran bewirkt (Jacque et al. 1998).

Anschließend entleert sich der Inhalt des Viruscapsids in die Wirtszelle („uncoating“). Die virale RNA wird im Zytoplasma durch das virale Enzym Reverse Transkriptase in provirale DNA umgeschrieben. An die Primer-Bindestelle (PBS) im 5' Bereich auf der RNA ist eine zelluläre tRNA^{Lys}, die bereits im viralen Partikel mit verpackt war, hybridisiert und dient damit als Primer bei der reversen Transkription (Renda et al. 2001). Die provirale DNA liegt zunächst im Zytoplasma vor, muß in den Zellkern gebracht werden und mit Hilfe der viralen Integrase in die DNA der Wirtszelle integriert werden. In latent infizierten ruhenden CD4⁺ T-Zellen liegt die provirale DNA nicht integriert im Zytoplasma vor und wird erst nach Aktivierung der T-Zelle in das Wirtsgenom integriert (Zack et al. 1990). Latent infizierten ruhenden CD4⁺ T-Zellen stellen daher u.a. mit Zellen des ZNS wichtige langlebige Virusreservoirs dar (Chun et al. 1997; Brack-Werner 1999; Brack-Werner und Bell 1999).

Die provirale DNA wird im sog. Präintegrationskomplex, der aus der neu synthetisierten viralen DNA, viralen und zellulären Proteinen besteht, in den Zellkern transportiert (Miller et al. 1997). Bei diesem Transport spielt u.a. das virale Protein Vpr eine Rolle, indem es den Präintegrationskomplex mit der Importmaschinerie verbindet, obwohl es selbst keine NLS Signalsequenz (vgl. 1.2.1) enthält (Nie et al. 1998; Popov et al. 1998; Vodicka et al. 1998).

Nach der Integration ins Wirtsgenom vermittelt der viralen Integrase fungiert die 5'-LTR als viraler Promotor. Hier binden auch zelluläre Transkriptionsfaktoren wie

NF- κ B und aktivieren damit die virale Transkription. Zunächst werden die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef synthetisiert. Das Tat Protein ist ein wichtiger Transkriptionsaktivator. Direkt nach der Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom kann Tat, das schon von der Transkription vor der Integration her stammt, Histon-Acetyltransferasen (HATs) rekrutieren. Durch die Aktivität der HATs werden die Nukleosomen an der LTR umgeordnet, so daß Transkriptionsfaktoren zutreten können. Tat kann die Transkription weiter stimulieren, indem es das sog. TAR-Element, eine Sekundärstruktur (stem-loop Struktur) im naszierenden RNA-Transkript, bindet und die zellulären Proteine Cyclin T und Cdk9 (cyclin-dependent protein kinase-9) rekrutiert, was zur Hyperphosphorylierung der RNA-Polymerase II führt (Wu 2004).

Die frühen Transkripte, die zu den regulatorischen Proteinen Tat, Rev und Nef führen, sind vollständig gespleißt. Jedoch werden in der späten Phase der HIV-Infektion im Zytoplasma auch unvollständig gespleißte Transkripte benötigt. So kodiert das ungespleißte Transkript für die Gag und Gag-Pol Proteine; einfach gespleißte mRNAs kodieren für Env, Vpu, Vif und Vpr. Der Export unvollständig gespleißter Transkripte wird durch das HIV Rev-Protein bewerkstelligt, siehe 1.2.

Das Env Vorläufer-Polyprotein gp160 wird im Endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisiert und im ER und Golgi-Apparat posttranslational modifiziert. Das gp160 Protein oligomerisiert in einen trimeren Komplex und wird stark glykosyliert. Das ungeschnittene Gag Polyprotein enthält drei wichtige Domänen: M für „membrane targeting“, I für „interaction“ und L, die sog. „late“ Domäne. Die M Domäne ist myristyliert und schafft Gag an die Plasmamembran. Die I-Domäne ist verantwortlich für die Interaktion der einzelnen Gag-Monomere miteinander. Das Ausknospen von HIV („Budding“) wird über die L-Domäne vermittelt. Dieser Prozeß wird genauer in 5.2.5 beschrieben (Gomez und Hope 2005; Zhu et al. 2006). Die Verpackung der viralen genomischen RNA wird vermittelt über eine Bindung an NC und das Verpackungssignal ψ , das nur in der kompletten viralen genomischen RNA vorhanden ist (Berkowitz et al. 1996). Zwei Kopien der viralen genomischen RNA bilden ein Dimer und werden in das Viruspartikel inkorporiert (Sundquist und Heaphy 1993; Paillart et al. 1996). Der genaue Mechanismus, wie die genomische virale RNA in das Viruspartikel gelangt, und welcher Zusammenhang dabei mit der Gag-Multimerisierung besteht, ist noch unbekannt, siehe z.B. Cimarelli und Darlix (2002). In dieser Arbeit wurde eine Hypothese („Assembly-Hypothese“) entwickelt, die dazu beitragen kann, diese offene Frage zu beantworten, siehe 4.4.2.2.1.

1.2 Das HIV-1 Rev-Protein

In dieser Arbeit wurden zwei neue Proteine identifiziert, die mit dem HIV-1 Rev (regulator of virion expression) Protein interagieren. Daher wird im folgenden auf wichtige Eigenschaften des Rev-Proteins eingegangen.

Das Rev-Protein besteht aus 116 Aminosäuren und besitzt damit ein Molekulargewicht von ca. 13 kD. Es ist phosphoryliert (Cochrane et al. 1989), und es läuft bei der SDS-PAGE bei ca. 17 kD (Nalin et al. 1990), vgl. Abbildung 30, 3.2.2.2. Es ist ein kleines basisches Protein, das z.B. in HeLa-Zellen im Zellkern in den Nukleoli lokalisiert ist (Cullen et al. 1988).

1.2.1 Funktion des Rev-Proteins

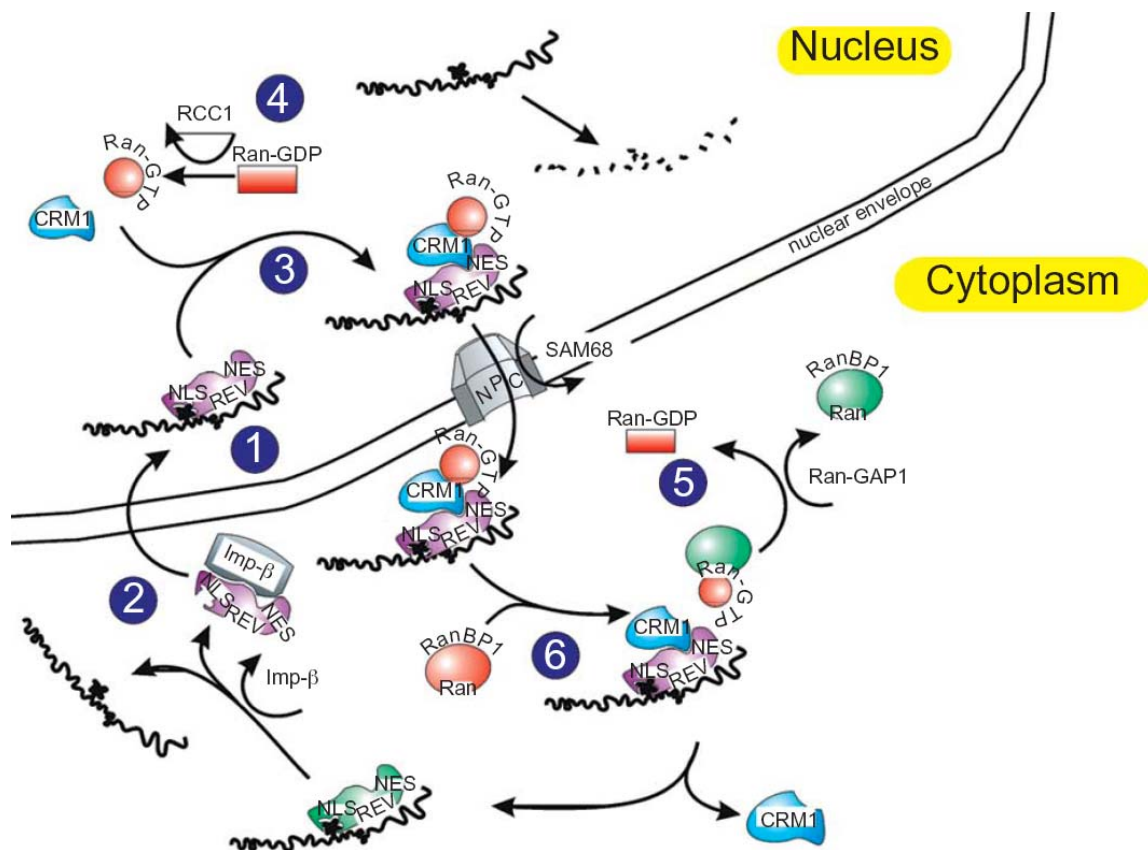


Abbildung 4: Transport des Rev-Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma. Erläuterungen siehe Text. Aus Strebel (2003).

Das Rev-Protein ist verantwortlich für den Export ungespleißter und partiell gespleißter viraler Transkripte aus dem Zellkern. Dagegen ist in der frühen Phase der HIV-Infektion der Export von vollständig gespleißten viralen Transkripten, die

für die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef codieren, Rev-unabhängig. In der späten Phase der HIV-Infektion bindet Rev unvollständig gespleißte und ungespleißte virale Transkripte und vermittelt deren Export aus dem Zellkern. Das Rev-Protein enthält ein Arginin-reiches RNA Bindemotiv (ARM, siehe 1.2.2), über das die Bindung einer Sekundärstruktur (stem-loop Struktur), dem Rev response element (RRE, siehe 1.2.3) im *env* Gen des viralen Transkripts, vermittelt wird (Malim et al. 1989), siehe Abbildung 4, Schritt 1. Das Arginin-reiche Motiv enthält auch das Signal für den Import in den Zellkern NLS (nuclear localization signal). Über das NLS erfolgt die direkte Interaktion mit dem Import-Faktor Importin- β (siehe Abbildung 4, Schritt 2 \rightarrow 1), ohne die Bindung eines Adapter-Moleküls wie Importin- α , was bei anderen Proteinen mit NLS üblich ist (Truant und Cullen 1999).

Im Zellkern bindet Rev das Transkript mit RRE zunächst an einer Stelle mit hoher Affinität (Tiley et al. 1992). Weitere Rev-Moleküle binden kooperativ, so daß es zur Oligomerisierung von Rev auf der RRE-RNA kommt (Thomas et al. 1998; Jain und Belasco 2001). Die Fähigkeit von Rev mit sich selbst zu interagieren, wurde von Daelemans et al. (2004) durch *in vivo* FRET (fluorescence resonance energy transfer) untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß in den Nukleoli, wo Rev im Gleichgewicht bei vielen Zelltypen überwiegend lokalisiert ist (Cullen et al. 1988), eine starke Rev-Rev Interaktion zu beobachten ist. Allerdings konnte auch eine Rev-Rev Interaktion im Zytoplasma beobachtet werden, wenn auch mit geringerer FRET-Effizienz, was auf geringere Interaktionsstärke schließen läßt. Die kooperative Oligomerisierung von Rev auf der RRE im Zellkern erfolgt vermutlich in der Weise, daß ein Rev Molekül mit dem nächsten in umgekehrter Orientierung („Kopf-an-Kopf und Schwanz-an-Schwanz“) interagiert (Jain und Belasco 2001). Der Export von Rev und gebundener RRE-RNA wird über das Export-Signal NES (nuclear export signal) vermittelt. Dieses Export-Signal enthält einen Abschnitt, der reich an der Aminosäure Leuzin ist (Wen et al. 1995; Meyer et al. 1996). Das zelluläre Protein Crm1 bindet Proteine, die das Export-Signal NES enthalten und vermittelt deren Export aus dem Zellkern, siehe Abbildung 4, Schritt 3 (Fornerod et al. 1997a; Bogerd et al. 1998). Crm1 bindet Rev über die NES und interagiert mit Proteinen des Kernporenkomplexes NPC (nuclear pore complex) (Fornerod et al. 1997b; Neville et al. 1997). Die zelluläre GTPase Ran reguliert die Interaktion zwischen Crm1 und Rev. Im Zellkern liegt Ran in GTP (Guanosin-Triphosphat)-gebundener Form vor, wohingegen Ran im Zytoplasma als Ran-GDP (Guanosin-Diphosphat) vorliegt. Verantwortlich für den GTP-GDP-Austausch sind im Zellkern das Protein RCC1 (regulator of chromosome condensation 1), das Ran-GTP generiert (siehe Abbildung 4 Schritt 4), und im Zytoplasma das Protein

Ran-GAP1, das die GTPase Funktion von Ran aktiviert und damit die Spaltung von GTP zu GDP bewirkt (siehe Abbildung 4 Schritt 5). Auf diese Weise wird also ein RanGTP-Gradient über die Zellkernmembran erzeugt, der wahrscheinlich für die Richtung der Transportvorgänge am Kernporenkomplex verantwortlich ist (d.h. Import in den / oder Export aus dem Zellkern) (Izaurrealde et al. 1997). Die hohe Konzentration von RanGTP im Zellkern bewirkt, daß der Export-Faktor Crm1 RanGTP und Rev über dessen NES Domäne binden kann. Dieser Komplex wird über den Zellkernkomplex (NPC = nuclear pore complex) ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma interagiert der Faktor RanBP1 mit RanGTP, woraufhin der Komplex aus Crm1, RanGTP und Rev dissoziiert (siehe Abbildung 4 Schritt 6) und die GTP-Hydrolyse in RanGTP stattfindet (Bischoff und Gorlich 1997). Der Export von Rev aus dem Zellkern scheint außerdem von dem zellulären Protein eIF-5A (eukaryotic initiation factor 5A) abhängig zu sein, siehe auch 1.3.2 (Ruhl et al. 1993; Bevec et al. 1996).

Ein weiteres zelluläres Protein, das eine Rolle beim Export von Rev aus dem Zellkern spielt, ist SAM68 (Li et al. 2002a, 2002b), siehe 1.3.2.

1.2.2 Struktur des Rev-Proteins

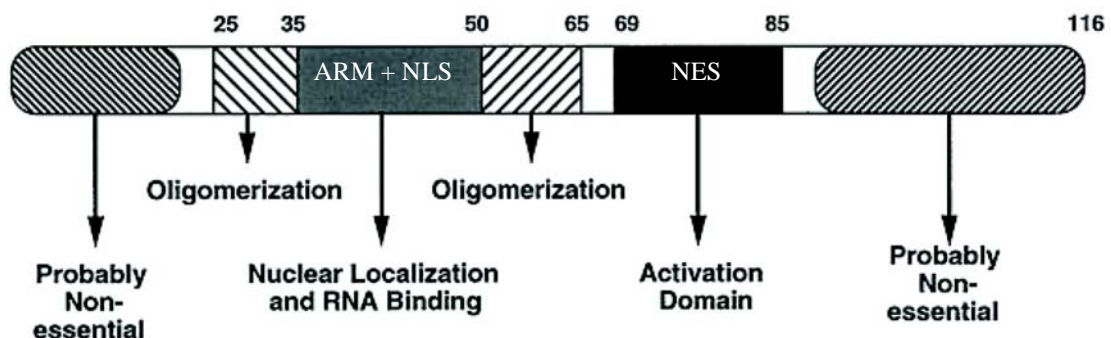


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänen des Rev-Proteins. Erläuterungen siehe Text. Aus Van Ryk und Venkatesan (1999).

Abbildung 5 zeigt schematisch den Aufbau des Rev-Proteins und seiner Domänen. In der aminoterminalen Hälfte liegt ein basischer Bereich, der das NLS (nuclear localization signal) Signal für den Import des Rev-Proteins in den Zellkern und die Lokalisation des Rev-Proteins in Nukleoli enthält (Hope et al. 1990). Das NLS besteht nach Kjems und Askjaer (2000) aus den Aminosäuren 38 bis 46

und enthält die Sequenz RRNRRRRWRER. Die NLS-Region liegt in einem Bereich, der auch als Arginin-reiche Region (ARM = arginine-rich motif) bezeichnet wird. Die ARM Region ist verantwortlich für die Interaktion von Rev mit viraler RRE-haltiger RNA, siehe 1.2.3. Beiderseits dieses basischen Bereichs liegen hydrophobe Multimerisierungsdomänen, siehe z.B. Cole et al. (1993); Thomas et al. (1998). In der carboxyterminalen Hälfte des Rev-Proteins liegt ein Bereich, der als Aktivierungs-Domäne oder Effektor-Domäne bezeichnet wird und der das NES (nuclear export signal) Signal enthält. Dieser Leuzin-reiche Bereich wird von Kjems und Askjaer (2000) auf die Aminosäuren 75 bis 83 eingegrenzt und enthält die Sequenz LPPLERLTL. Das NES Signal ist verantwortlich für den Transport aus dem Zellkern, siehe 1.2.1.



Abbildung 6: Vorausgesagte Sekundärstruktur des Rev-Proteins. Aus Watts et al. (1998).

Die vermutete Sekundärstruktur des Rev-Proteins ist in Abbildung 6 dargestellt. Im aminoterminalen Bereich liegt demnach ein „Helix-turn-helix“-Motiv, das für die Interaktion des Rev-Proteins mit RRE-RNA wichtig ist (Auer et al. 1994; Battiste et al. 1996). In der carboxyterminalen Hälfte liegen einige Bereiche, die durch eine β -Faltblatt-Struktur gekennzeichnet sind.

Die dreidimensionale Tertiärstruktur des gesamten Rev-Proteins ist unbekannt, da es bisher nicht gelungen ist, das Rev-Protein vollständig zu kristallisieren. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich, daß v.a. der C-Terminus von Rev in seiner Struktur sehr flexibel ist (Auer et al. 1994) und Rev daher alleine keine einheitliche Kristallstruktur ausbilden kann. Darüber hinaus besitzt Rev eine starke Tendenz, in Lösung multimere Komplexe zu bilden (Havlin et al. 2007; Wingfield et al. 1991; Cole et al. 1993). Durch Co-Kristallisation mit einem Protein, das direkt und relativ stark mit Rev interagiert und Rev in seiner gesamten Länge bindet und damit strukturell stabilisiert, wäre wahrscheinlich die Aufklärung der Rev-Struktur möglich. In dieser Arbeit wurde mit B1-1 ein Rev-interagierendes Protein identifiziert, das möglicherweise für eine Co-Kristallisation mit Rev geeignet ist, siehe 4.4.1.1 und 4.6.

1.2.3 Interaktion zwischen Rev und RRE-haltiger viraler RNA

Das RRE Element (Rev response element) ist ein Sequenzabschnitt der viralen RNA im Bereich des *env* Gens und in allen einfach- und ungespleißten RNA-Spezies enthalten. Die RRE ist durch eine ausgeprägte Sekundärstruktur gekennzeichnet (siehe Abbildung 7), und ihre gesamte Länge beträgt 351 Nucleotide (Mann et al. 1994).

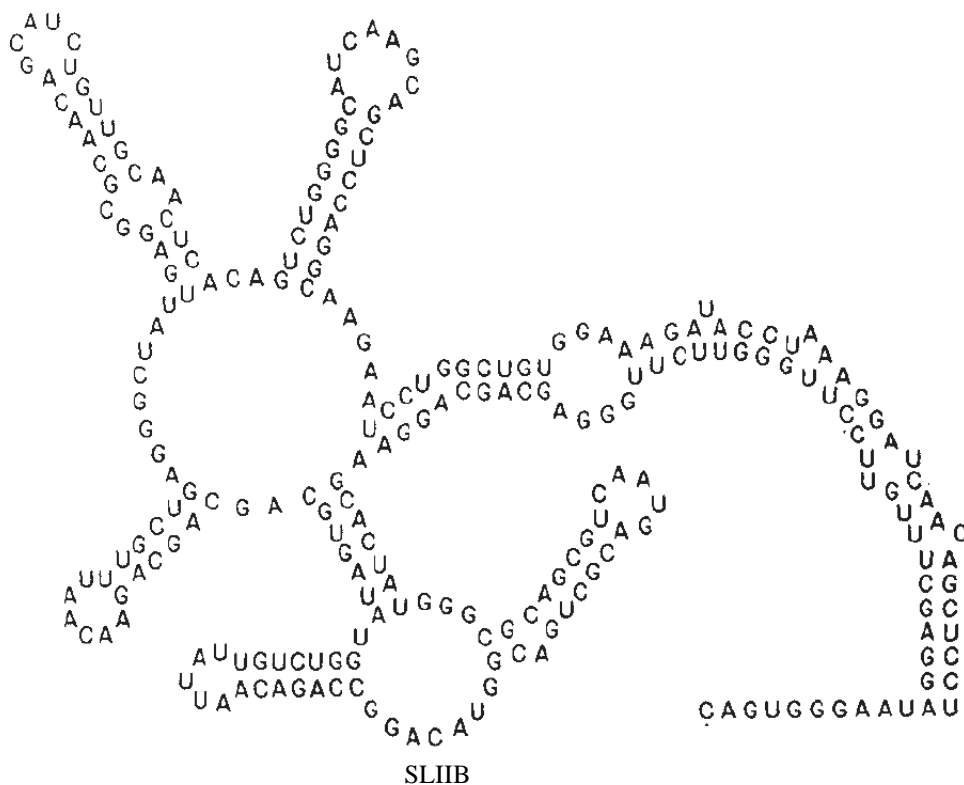


Abbildung 7: Struktur der RRE (Rev response element). Verändert aus Malim et al. (1989).

Rev kontaktiert die RRE über sein Helix-turn-helix-Motiv (siehe 1.2.2) an einer bestimmten Stelle, die in der sog. SLIIB-Struktur (siehe Abbildung 7) liegt, mit hoher Affinität (Heaphy et al. 1991; Zimmel et al. 1996). In der SLIIB-Struktur liegen zwei Nicht-Watson-Crick Basenpaarungen (G-A und G-G), so daß die Doppelhelix der RRE-RNA in diesem Bereich aufgeweitet wird und der Zutritt des ersten Rev-Moleküls ermöglicht wird (Williamson et al. 1995). Weitere Rev-Moleküle binden die RRE-RNA, indem sie in kooperativer Weise schon gebundene Rev-Moleküle über die Multimerisierungsdomäne und die RRE-RNA über das ARM-Motiv kontaktieren (Jain und Belasco 2001). Auf diese Weise oligomerisiert Rev auf der RRE-RNA (Zimmel et al. 1996; Charpentier et al. 1997). Die Oligo-

merisierung von Rev auf der RRE-RNA könnte in der HIV-infizierten Zelle als „molekularer Rheostat“ dienen und einen Sensor für die Rev-Konzentration in der Zelle darstellen (Mann et al. 1994). Die Oligomerisierung von Rev ist essentiell für die HIV Replikation, siehe z.B. Pomerantz et al. (1990, 1992); Malim und Cullen (1991).

1.3 Antivirale Therapien gegen HIV

Im folgenden wird eine kurze Übersicht über einige Aspekte der antiviralen Therapie gegen HIV gegeben. Dabei wird in 1.3.1 auf die wichtigsten Prinzipien der etablierten HAART (highly active antiretroviral therapy) Therapie eingegangen. In 1.3.2 werden einige neue (noch) nicht etablierte Therapie-Strategien vorgestellt.

1.3.1 HAART („highly active antiretroviral therapy“)

In der gängigen antiviralen Therapie gegen HIV werden vier unterschiedliche Wirkstoffklassen eingesetzt:

1. Nukleosidanaloga,
2. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase Inhibitoren,
3. Proteaseinhibitoren und
4. der Fusionshemmer T20.

In der HAART Therapie wird in der Regel eine Kombination aus drei Wirkstoffen aus mindestens zwei Wirkstoffklassen benutzt (Chen et al. 2007). Eine kurze Übersicht geben z.B. Nielsen et al. (2005) und Temesgen et al. (2006).

Nukleosidanaloga, auch als NRTIs bezeichnet, greifen am viralen Enzym Reverse Transkriptase RT an. Sie stellen alternative Substrate für die RT dar und führen zum Kettenabbruch bei der reversen Transkription. Die Nukleosidanaloga müssen erst durch die Zelle aktiviert werden, indem sie zu Triphosphatderivaten phosphoryliert werden. Nukleosidanaloga, die um verschiedene Basen konkurrieren, können in der Therapie kombiniert werden. Das Thymidin-Analog AZT wurde 1987 als erstes antiretrovirales Medikament überhaupt eingesetzt (Fischl et al. 1987).

Der Angriffspunkt der Nicht-Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs) ist ebenfalls die Reverse Transkriptase. Allerdings stellen NNRTIs keine Substrate für die RT dar, sondern binden das Enzym nahe des aktiven Zentrums und blockieren so die katalytische Aktivität der RT. Demzufolge müssen NNRTIs auch nicht wie NRTIs von der Zelle durch Phosphorylierung aktiviert werden.

Das gag-pol Polyprotein wird durch die virale Protease in seine Untereinheiten gespalten. Wenn diese Spaltung durch Proteaseinhibitoren (PIs) verhindert wird, entstehen nicht-infektiöse Viruspartikel. Die Aufklärung der Molekülstruktur der viralen Protease führte zur Entwicklung von Proteaseinhibitoren, die genau in das aktive Zentrum der Protease passen (Eron 2000).

T20 ist der erste zugelassene Wirkstoff aus der Klasse der sog. „Entry-Inhibitoren“, die den Eintritt von HIV in die Wirtszelle hemmen. T20 ist ein Peptid von 36 Aminosäuren und einem Abschnitt der HR2-Region aus gp41 homolog. Es bindet die HR1-Region in gp41 und blockiert dadurch die Bildung der sog. „6-helix bundle“ Struktur, die für die Fusion notwendig ist (Oldfield et al. 2005). T20 wird subkutan appliziert. Antikörper gegen das T20 Peptid werden zwar gebildet, diese beeinträchtigen aber angeblich nicht die Wirkung von T20 (Walmsley et al. 2003). Resistenzen gegen T20 treten zwar auf, reduzieren aber die virale Fitneß (Lu et al. 2004; Menzo et al. 2004). Multiresistente Viren, die mit NRTIs, NNRTIs und PIs nicht behandelt werden können, sind empfindlich gegenüber T20.

Die antivirale Therapie gegen HIV mit den eben beschriebenen Wirkstoffklassen ist vor allem mit zwei generellen Problemen behaftet, nämlich einerseits mit mangelnder Wirksamkeit, v.a. aufgrund von Resistenzentwicklung (de Mendoza et al. 2002), und andererseits mit teils erheblichen Nebenwirkungen.

So entstehen bei Behandlung mit Nukleosidanaloga oft Resistenzen (Naeger et al. 2001; Clavel und Hance 2004; Meyer et al. 2000). Außerdem kann es zu mitochondrialer Toxizität kommen, da NRTIs auch die humane mitochondriale DNA-Polymerase in gewissem Umfang hemmen (Brinkman et al. 1999). Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren sind zwar frei von mitochondrialer Toxizität – es treten aber schnell Resistenzmutationen auf. Bei den Nebenwirkungen der Proteaseinhibitoren steht v.a. die Lipodystrophie im Vordergrund (Nolan 2003).

1.3.2 Neue und experimentelle Therapie-Strategien

Im folgenden werden einige ausgewählte neue und experimentelle Therapie-Strategien gegen HIV dargestellt.

Neue Entry-Inhibitoren

Es gibt verschiedene neue Strategien, das Eindringen von HIV in die Wirtszelle zu verhindern. Sogenannte „Attachment-Inhibitoren“ zielen darauf ab, das Andocken von gp120 an den CD4 Rezeptor zu verhindern. Eine Strategie war es, lösliche CD4 Moleküle einzusetzen, die mit den CD4 Rezeptoren auf der Wirtszelle konkurrieren sollten (Daar et al. 1990; Schooley et al. 1990). Eine ähnliche Strategie ist der Einsatz eines löslichen tetravalenten Antikörpers, der die CD4 Bindungsstelle von HIV auf seiner Oberfläche trägt (PRO 542).

Die Blockierung der Co-Rezeptoren für den Eintritt von HIV in die Zelle ist eine weitere Strategie. Die beiden wichtigen Co-Rezeptoren für HIV sind CCR5 und CXCR4. Die Blockierung des CCR5 Co-Rezeptors ist von den zu erwartenden Nebenwirkungen her wahrscheinlich unproblematisch, da Menschen mit einem CCR5-Defekt klinisch nicht auffällig, aber nahezu resistent gegenüber Infektion mit M-tropen Viren sind, siehe 1.1.6. Eine Blockierung des CXCR4 Co-Rezeptors ist dagegen wahrscheinlich problematischer. So sind beim Menschen keine harmlosen Defekte von CXCR4 bekannt, und eine Blockierung von CXCR4 hatte im Tierversuch weitreichende Konsequenzen (Zou et al. 1998). Trotzdem gibt es Versuche, den CXCR4 Co-Rezeptor mit Hilfe kleiner synthetischer Moleküle zu blockieren (Schols et al. 1997) oder gentherapeutisch mit Hilfe von siRNA (siehe unten) oder anderer Maßnahmen die Expression von CXCR4 oder auch CCR5 in den Zellen herunterzuregulieren (Chen et al. 1997).

Antivirale Strategien, die am HIV Rev-Protein (direkt oder indirekt) ansetzen

Das HIV Rev-Protein ist aufgrund seiner zentralen Rolle im HIV Replikationszyklus (1.1.6, 1.2.1) prädestiniert dafür, einen Angriffspunkt für antivirale Strategien gegen HIV darzustellen. So gibt es keine zellulären homologen Proteine zu Rev (außer von humanen endogenen Retroviren abstammende Rev-ähnliche Moleküle wie K-Rev von HERV-K (Yang et al. 1999)). Ebenso existiert kein zelluläres Protein, das ein fehlendes Rev-Protein funktionell ersetzen könnte. Hier liegen also Virus-eigene Strukturen und Funktionen vor, und es besteht damit die Chance, spezifisch das Virus therapeutisch zu treffen, ohne zelluläre Strukturen und Funktionen zu beeinträchtigen.

Trotzdem gibt es bislang noch keine etablierte Therapie, die am Rev-Protein ansetzt. Die meisten Ansätze sind aufgrund zu geringer Wirksamkeit oder zu hoher Toxizität gescheitert; einige wenige Ansätze hingegen befinden sich in klinischen Versuchen.

Ein gut charakterisiertes trans-dominant negativ wirkendes Protein ist die Rev-Mutante RevM10, bei der die NES-Region mutiert ist. RevM10 kann mit *wildtyp* Rev oligomerisieren und im Zellkern RRE-RNA binden, diese aber nicht exportieren, da die Interaktion mit dem Export-Faktor Crm1 in RevM10 verhindert ist (Stauber et al. 1995). Aufgrund seiner transdominant-negativen Wirkung inhibiert RevM10 die Funktion von *wildtyp* Rev und damit die HIV Replikation, wenn es in humanen T-Zellen exprimiert wird (Bevec et al. 1992; Bonyhadi et al. 1997).

T-Zellen, die aus HIV-Patienten gewonnen wurden, zeigten eine längere Überlebensdauer, wenn sie mit Expressionskonstrukten für RevM10 transduziert wurden (Woffendin et al. 1996). Jedoch werden für eine effiziente Hemmung hohe Spiegel an RevM10 in den Zellen benötigt (Plavec et al. 1997).

Ein weiteres Rev-inhibierendes Protein ist Sam68 Δ C, eine dominant negativ wirkende Mutante des zellulären Proteins Sam68 (Src-associated protein in mitosis 68), bei dem der C-Terminus deletiert wurde. Sam68 ist beteiligt am Rev-bedingten viralen RNA Export und essentiell für die HIV Replikation (Modem et al. 2005). Sam68 Δ C ist zytoplasmatisch lokalisiert und bindet Rev wahrscheinlich direkt, so daß Rev vom Transport in den Zellkern abgehalten wird – möglicherweise indem Sam68 Δ C das NLS Signal in Rev maskiert. Das NLS Signal von Sam68 ist in der Mutante Sam68 Δ C deletiert. So kann Rev seine Funktionen im Zellkern nicht erfüllen, und die HIV-Replikation ist dadurch inhibiert (Reddy et al. 1999).

Eine weitere Protein-basierte Strategie ist die Expression eines anti-Rev single-chain Antikörpers (sFv). Die variablen Regionen von leichter und schwerer Kette eines monoklonalen Antikörpers gegen Rev wurden intrazellulär exprimiert. sFvs gegen Rev rekrutieren das Rev-Protein ins Zytoplasma und beschleunigen so die Degradation des Rev-Proteins. Sie hemmen daher die HIV-Replikation (Duan et al. 1994).

Die Interaktion zwischen Rev und der viralen RRE-RNA war Angriffspunkt vieler antiviraler Strategien. So wurden sog. „RRE RNA decoys“ eingesetzt, um Rev von der Bindung der viralen RRE abzuhalten, indem Rev statt dessen das decoy

binden sollte. Dabei handelte es sich um kurze Nukleotid-Sequenzen, die Sequenzen aus der viralen RRE enthielten und in Zellen überexprimiert wurden. So wurde ein 41 Nukleotide langes decoy, das der RRE-Sequenz SLIIB entsprach (siehe 1.2.3) in klinischen Studien untersucht (Lamothe und Joshi 2000; Lee et al. 1992).

Eine weitere Strategie, die die Interaktion zwischen Rev und viraler RRE-RNA ausnutzte, war die Konstruktion von Fusionsproteinen aus Rev und einer Nuklease. Damit sollte erreicht werden, daß die von diesem Fusionsprotein gebundene virale RRE-RNA geschnitten wird (Singwi und Joshi 2000).

Ein anderer Ansatzpunkt ist der Einsatz von siRNAs, um die Expression von Rev zu hemmen. Über den Prozeß der RNA-Interferenz (RNAi) kann die posttranskriptionelle Inaktivierung von Genen erreicht werden. Hierbei inaktivieren doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) spezifisch Gene mit komplementären Sequenzen. Dabei werden dsRNA Moleküle durch die RNase Dicer in 21 Nukleotide lange dsRNAs geschnitten, die „small interfering RNAs“ oder siRNAs genannt werden. Diese siRNAs bewirken RNA-Interferenz, indem sie den „RNA induced silencing complex“ rekrutieren und so die Degradation der komplementären mRNA veranlassen. Durch Einbringen von siRNAs in Zellen kann daher spezifisch die Expression von mRNAs, die komplementäre Sequenzen enthalten, gehemmt werden (Sharp 2001). So wurden auch siRNAs mit Komplementarität zur Rev-Sequenz eingesetzt mit dem Ergebnis, daß die HIV-Replikation inhibiert wurde (Coburn und Cullen 2002; Lee et al. 2002).

Strategien mit Wirkstoffen von kleinem Molekulargewicht („small molecular weight compounds“) zielten auf eine Inhibierung der Interaktion von Rev mit zellulären Co-Faktoren oder der RRE-RNA ab. Da diese Wirkstoffe meist mit zellulären Proteinen interagieren, verursachen sie in der Regel zytotoxische Effekte und sind klinisch nicht einsetzbar. So bindet z.B. Leptomycin B (LMB) an den Export-Faktor Crm1 und verhindert somit die Interaktion von Crm1 mit Rev. Daher kann Rev also nicht aus dem Zellkern exportiert werden und somit seine normale Funktion nicht erfüllen (siehe 1.2.1) (Wolff et al. 1997). Allerdings wird ebenfalls der Export zellulärer Proteine mit NES, wie z.B. PKI, inhibiert (Fornerod et al. 1997a).

Der interkalierende Farbstoff Pyronin Y hemmt die Rev-RRE Interaktion. Da er aber auch in DNA interkaliert, verursacht er starke zytotoxische Effekte und ist für eine Inhibierung der HIV-Replikation nicht einsetzbar (Heguy 1997).

Eine weitere Strategie, die an einem zellulären Co-Faktor von Rev ansetzt, ist die folgende. Das zelluläre Protein eIF5A ist für die Rev-Funktion essentiell. Es enthält als einziges bekanntes Protein die modifizierte Aminosäure Hypusin. Hypusin wird u.a. durch das Enzym DHS (Deoxyhypusin-Synthase) an eIF5A generiert. Inhibierung von DHS durch den Wirkstoff CNI-1493 (N,N-bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazonoethyl]phenyl]decandiamid-tetrahydrochlorid) oder RNA-Interferenz hemmt die HIV Replikation (Hauber et al. 2005).

Die gängige HIV Therapie und auch neue Strategien sehen sich v.a. mit zwei wichtigen Problemen konfrontiert. Da eine Eradikation von HIV nicht möglich ist, muß die Therapie über Jahrzehnte durchgeführt werden; daher sollten die Medikamente keine Langzeit-Toxizität zeigen. Die gängigen Medikamente (außer das Peptid T20) sind aber z.T. mit erheblicher Toxizität und damit Nebenwirkungen verbunden (s.o.). Das zweite Problem ist die Entwicklung von Resistenzen. So entstehen in einem HIV-infizierten Menschen (mit Behandlung durch einen Protease-Inhibitor) täglich ca. $10,3 \cdot 10^9$ neuer Viruspartikel (Perelson et al. 1996). Es entstehen dabei u.a. aufgrund der hohen Fehlerrate der Reversen Transkriptase ständig neue Mutationen und somit Virusvarianten, die auch als „Quasispezies“ bezeichnet werden. Unter antiviraler Therapie werden resistente Varianten herausselektiert, die schrittweise immer stärkere Resistenzen akkumulieren können (Drake 1993).

Daher besteht die Notwendigkeit, neue HIV-Therapien zu entwickeln, die wirksam und verträglich sind. Wirksamkeit heißt in diesem Fall, daß der neue Wirkstoff auch gegen multiresistente Viren wirken soll. Das kann am besten erreicht werden, indem einerseits der Wirkstoff in Replikationsprozesse von HIV eingreift, die von gängigen Wirkstoffen nicht angegriffen werden, und andererseits indem der neue Wirkstoff so spezifisch wie möglich nur in den Replikationszyklus von HIV eingreift. Durch eine möglichst hohe Spezifität kann gleichzeitig auch eine gute Verträglichkeit erreicht werden, da normale zelluläre Prozesse durch einen hochspezifischen antiviralen Wirkstoff nicht blockiert werden sollten.

Das HIV-Rev-Protein stellt aufgrund seiner zentralen Rolle im HIV Replikationszyklus (siehe 1.1.6, 1.2.1) einen vielversprechenden Angriffspunkt für neue antivirale Wirkstoffe dar. Proteine können aufgrund ihrer komplexen dreidimensionalen Struktur andere Proteine mit höchstmöglicher Spezifität binden. Zelluläre Proteine oder Peptide hiervon, die in therapeutischer Absicht appliziert werden,

sind mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in hohem Maße verträglich, da sie eben natürlicherweise in der Zelle vorkommen. Außerdem werden höchstwahrscheinlich auch keine neutralisierenden Antikörper gebildet, da der Organismus immunologisch tolerant gegenüber diesen Proteinen bzw. Peptiden sein sollte. Daher ist es ein vielversprechendes Vorhaben, neue zelluläre Proteine (oder Peptide hiervon) zu identifizieren, die das HIV Rev-Protein möglichst direkt und stark, d.h. mit möglichst hoher Spezifität, binden können.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Rev-interagierende zelluläre Proteine (oder Fragmente hiervon) zu finden. Dabei wird mit einem bakteriellen Zwei-Hybrid-System eine Methodik angewendet, die es erlaubt, Interaktoren zu finden, die Rev erstens möglichst direkt und zweitens mit möglichst hoher Affinität binden.

Diese neu identifizierten Rev-interagierenden Proteine können einerseits Co-Faktoren für die Rev-Funktion darstellen und so wichtige Hinweise auf noch unbekannte Prozesse bei der Interaktion zwischen HIV und Wirtszelle bieten.

Andererseits können die neu identifizierten Rev-Interaktionspartner die normale Funktion des Rev-Proteins blockieren, insbesondere wenn sie Rev direkt und mit relativ hoher Affinität binden. In diesem Fall können die für die Rev-Funktion nötigen zellulären Proteine oder auch weitere Rev-Moleküle (Rev Oligomerisierung) oder virale RRE-RNA nicht mehr von Rev gebunden werden, v.a. dann wenn die Interaktionsstärke mit diesen für die Rev-Funktion nötigen Faktoren geringer ist als die des neuen direkt bindenden Rev-inhibierenden Proteins. Es würde so zu einer Blockierung des Rev-Proteins kommen und aufgrund der zentralen Rolle von Rev im HIV-Replikationszyklus eine Inhibierung der HIV-Replikation erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Name	Bezugsquelle
• β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
• 2log DNA-Längenstandard	New England Biolabs, Schwalbach
• 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol)	Sigma, Deisenhofen
• Adenin HCl	Sigma, Deisenhofen
• Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
• Bacto Agar	Gibco, Karlsruhe
• Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
• Chloramphenicol	Sigma, Deisenhofen
• Chloroform	Merck, Darmstadt
• Dimethyl-Formamid	Sigma, Deisenhofen
• Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
• DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
• dNTPs	Pharmacia Biotech, Freiburg
• EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Deisenhofen
• EGTA (Ethyleneglycol-bis(b-aminoethyl)-N,N,N',N'- tetraessigsäure)	Sigma, Deisenhofen
• Ethanol	Merck, Darmstadt
• Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
• Fötale Kälberserum FKS	Gibco, Karlsruhe
• His dropout amino acid supplement	BD Biosciences, Clontech
• Immersol 518 F Immersionsöl	Carl Zeiss, Oberkochen
• IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactosid)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
• Isopropanol	Merck, Darmstadt
• Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
• Methanol	Merck, Darmstadt
• Milli-Q Wasser	Filtration durch Millipore Anlage (Millipore Water System, Eschborn)
• Natriumazetat	Sigma, Deisenhofen
• ONPG (2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid)	Sigma, Deisenhofen
• Protease-Inhibitor Tabletten („Complete Mini“)	Roche

• ProteinG Sepharose („ImmunoPure Immobilized Protein G“)	Pierce
• Proteinmarker Full range rainbow recombinant protein molecular weight marker	Amersham Pharmacia Biotech
• Proteinmarker Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kD)	New England Biolabs, Schwalbach
• Proteinmarker SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen
• SDS (Natriumdodecylsulfat)	Löwe Biochemika, München
• SeaKem LE Agarose	FMC Bio Products, Rockland, USA
• Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
• Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
• Thiamin HCl	Sigma, Deisenhofen
• Tris	Löwe Biochemika, München
• Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
• Tween 20	Sigma, Deisenhofen
• weitere Chemikalien als Reinsubstanz	in der Regel Sigma, Deisenhofen
• X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Oligonukleotide für die PCR wurden in der AG BIODV von Herrn Utz Linzner in der GSF, Neuherberg synthetisiert bzw. bezogen von der Firma Metabion international AG, Martinsried.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
• 10 x M9 Salze	64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 g KH_2PO_4 2,5 g NaCl 5 g NH_4Cl in 0,5 Liter sterilem Wasser gelöst bei RT in 100 ml aliquotiert Autoklaviert Bei 4 °C gelagert
• 5x TBS (pH 7,6)	Tris Base 250 mM NaCl 7500 mM Mit 1N HCl auf pH 7,6 gebracht

<ul style="list-style-type: none"> • Antibiotische-Antimykotische Lösung (100x) (Gibco) 	<p>10000 Units/ml Penicillin G Lösung 10000 µg/ml Streptomycin Lösung 25 µg/ml Amphotericin B als Fungizone in 0.85 % Saline</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Auftragspuffer für DNA 	<p>0,25 % Bromphenolblau 40 % (w/v) Sucrose Lagerung bei 4 °C</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Coomassie-Entfärbelösung 	<p>50 % (v/v) Ethanol 7,5 % (v/v) Essigsäure</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Dephosphorylierungspuffer (10x) (Roche) 	<p>0,5 M Tris-HCl 50 mM MgCl₂, pH 8,5</p>
<ul style="list-style-type: none"> • DMEM (Gibco) 	<p>mit Glutamax-I (L-Analyt-L-Glutamin) und 4,5 g/l Glucose</p>
<ul style="list-style-type: none"> • DMEM ohne Phenolrot (Gibco) 	<p>mit Glutamax-I (L-Analyt-L-Glutamin) und 4,5 g/l Glucose</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Einfriermedium für Bakterien 	<p>2 Teile 80 % Glycerol 1 Teil 10 mM MgCl₂</p>
<ul style="list-style-type: none"> • LB-Medium (nach Luria-Bertani) 	<p>10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl Aqua dest. auf 1 l, pH 7,0</p>
<p>M9 Additiv für 500 ml M9+ Medium (67,5 ml)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lösung 1: 	<p>10 ml 20 % D(+)Glucose – steril gefiltert 5 ml 20 mM Adenin HCl – steril gefiltert 50 ml 10x His Dropout Supplement</p>
<p>M9 Additiv für 500 ml M9+ Medium (67,5 ml)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lösung 2: 	<p>0,5 ml einer 1 M MgSO₄ Lösung 0,5 ml einer 1 M Thiamin HCl Lösung 0,5 ml einer 10 mM Lösung ZnSO₄ 0,5 ml einer 100 mM Lösung CaCl₂ 0,25 ml aus 100 mM IPTG alle Komponenten steril gefiltert</p>
<ul style="list-style-type: none"> • MES SDS Laufpuffer (20x) (Invitrogen) 	<p>MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) 1M Tris Base 1 M SDS 69,3 mM pH 7,3</p>
<ul style="list-style-type: none"> • NuPAGE LDS Probenpuffer (4x) (Invitrogen) 	<p>4 g Glycerin 0,682 g Tris Base 0,666 g Tris HCl 0,800 g LDS 0,006 g EDTA 0,75 ml einer 1 % Lösung Serva Blue G250 0,25 ml einer 1 % Lösung Phenol Rot mit Wasser auf 10 ml</p>

Material und Methoden

• NuPAGE Reducing Agent (Invitrogen)	0,5 M DTT in stabilisierter Form
• NuPAGE Transfer Buffer (20x) (Invitrogen)	500 mM Bicin 500 mM Bis-Tris 20,5 mM EDTA 1 mM Chlorobutanol
• ONPG-Lösung (Substrat für β -Galactosidase)	4 mg/ml ONPG (2-Nitrophenyl- β -D-galactosid) in Puffer Z (siehe unten) (stets frisch angesetzt)
• PBS	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 9,7 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM KH_2PO_4
• PBS-T	0,1 % Tween20 in PBS
• Puffer für die Co-Immunopräzipitation-	10 % Glycerol 0,1 % Triton X100 15 mM EGTA 5x TBS 1 μM DTT
• Puffer Z (für den β -Galactosidase-Assay)	0,06 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,04 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,01 M KCl 0,001 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M 2-Mercaptoethanol
• SDS PAGE Probenpuffer (2x)	0,09 M Tris-Cl, pH 6,8 20 % Glycerin 2 % SDS 0,02 % Bromphenolblau 0,1 M DTT
• SOC-Medium (Gibco)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 20 mM Glucose auf 1 l mit Aqua dest., pH 7,0
• Stripping Buffer	100 mM β -Mercaptoethanol 2 % SDS 62,5 mM Tris, pH 6,7 oder 0,1 M Glycin 0,1 % SDS pH 2,2

• TAE (50x)	2 M Tris-Acetat 100 mM Na ₂ -EDTA 10 mM Tris-HCl
• TE	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 1 mM EDTA
• Trypsin/EDTA Lösung (Biochrom, Berlin)	0,05 % (w/v) Trypsin 0,02 % (w/v) EDTA in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺
• Westernblot-Puffer für bakterielle Zellen	50 mM EDTA 1 Spatelspitze Lysozym 5 µl Benzonase + nach Bedarf 1/2 Protease-Inhibitor Tablette auf 2 ml auffüllen mit PBS
• Westernblot-Puffer für humane Zellen	10 % Glycerol 0,1 % Triton X100 15 mM EGTA 5x TBS 1 µM DTT
• X-Gal Lösung	2 % X-Gal in N,N-Dimethylformamid

2.1.3 Medien für Bakterien

Als Standard-Medium für Bakterien wurde LB-Medium benutzt (siehe 2.1.2). Unmittelbar nach Transformationen wurden Bakterien für 1 bis 1,5 Stunden in SOC-Medium hochgezogen, bevor sie auf Agarplatten mit dem entsprechenden Medium (z.B. LB oder M9) ausplattiert wurden.

Für Wachstum im BMI-System wurde LB-Medium verwendet. Wachstum von Bakterien des BMII-Systems erfolgte in Histidin-Mangelmedium M9 His DO.

M9+ His-dropout Flüssigmedium 500 ml

- 380 ml steriles Wasser in eine 500 ml Flasche geben
 - 50 ml 10x M9 Salze zugeben
 - eine Präparation (67,5 ml) M9 Additiv für 500 ml M9+ Medium (s.o.) zugeben
- bei 4 °C maximal einen Monat lagern und vor Gebrauch auf RT erwärmen.

Permissivmedium 500 ml Agar (20 µM IPTG)

- 380 ml steriles Wasser in eine 500 ml Flasche geben
- 7,5 g Bacto Agar zugeben
- autoklavieren bei 121 °C für 20 Minuten
- in Mikrowelle verflüssigen – beim Abkühlen bei 70 °C 50 ml 10x M9 Salze zugeben

- zu einer Präparation (67,5 ml) M9 Additiv für 500 ml M9+ Medium (s.o.)
1,25 ml Chloramphenicol aus 10 mg/ml stock,
100 µl aus 100 mM IPTG stock und
625 µl Tetracyclin aus 10 mg/ml stock dem Agar zugeben wenn er auf 50 °C abgekühlt ist
- zu ca. 25 ml in 100mm Petriplatten gießen
Platten in Alufolie maximal 1 Monat bei 4 °C lagern

Selektivmedium 500 ml Agar (5 mM 3-AT)

Wie Permissivmedium, wobei zusätzlich 2,5 ml 1 M 3-AT zugegeben werden, wenn der Agar auf 50 °C abgekühlt ist.

Antibiotika:

Antibiotikum	Eingesetzte Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml
Streptomycin	12,5 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

2.1.4 Medien für humane Zellen

Für humane Zellen wurde DMEM-Medium benutzt, dem 10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum und 1 % Antibiotisch-Antimykotische Lösung zugesetzt wurden.

Bei mikroskopischen Aufnahmen (siehe z.B. die Co-Lokalisation 3.2.2.1) wurde DMEM ohne Phenolrot mit 10 % hitzeinaktiviertem fötales Kälberserum benutzt, um die optische Bildqualität nicht durch Phenolrot negativ zu beeinflussen.

HeLa-Zellen wurden eingefroren in DMEM-Medium mit 20 % hitzeinaktiviertem fötales Kälberserum, 10 % DMSO und 1 % Antibiotisch-Antimykotischer Lösung.

2.1.5 Kits

Name	Hersteller
• BD In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit	BD Clontech
• Cytotox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega
• ECL Westernblot Detektions-System	Amersham Pharmacia Biotech
• FuGENE 6 Transfektions Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

• NucleoBond PC 500 (für Plasmid-DNA-Maxi Präparationen)	Macherey Nagel
• NucleoSpin Extract (für DNA-Isolationen aus Agarose-Gelen und Aufreinigung von PCR-Produkten)	Macherey Nagel
• NucleoSpin Plasmid (für Plasmid-DNA-Mini Präparationen)	Macherey Nagel
• Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.6 Enzyme

Name	Hersteller
• Benzonase	Benzon Pharma A/S
• Herculase hotstart DNA Polymerase	Stratagene
• Diverse Restriktionsenzyme	in der Regel bezogen von New England Biolabs, Schwalbach; auch von Promega, Madison, USA
• Lysozym	Boehringer Mannheim
• Shrimp Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.7 Antikörper

Erstantikörper

anti-Rev-Antikörper (5C6-1-)

monoklonaler Antikörper aus Ratte, gegen die NES von Rev gerichtet (keine Reaktion mit RevM10) (E. Kremmer, GSF, Neuherberg);

eingesetzte Verdünnung: 1:500

Kaninchen-anti-GFP Antikörper

Rabbit anti-GFP Antikörpers (Invitrogen). Dieser Antikörper wurde als fällender Antikörper bei der Co-Immunopräzipitation (siehe 2.2.6) eingesetzt. Die Konzentration des Antikörpers betrug 2 µg/µl.

Maus-anti-GFP Antikörper

Monoklonaler Antikörper von Living Colors A.v. (BD Clontech, Düren)

eingesetzte Verdünnung: 1:1000

Zweitantikörper

anti-Ratte-Antikörper

mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter Anti-Ratte-Antikörper aus Ziege (Dianova)

anti-Kaninchen-Antikörper

mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziege (Dianova)

anti-Maus-Antikörper

mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter Anti-Maus-Antikörper aus Ziege (Dianova)

Alle Zweitantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt.

2.1.8 Plasmide

Verwendete vorhandene Plasmide

Folgende Plasmide wurden unverändert für Experimente eingesetzt bzw. dienten als Ausgangsprodukt für Klonierungen.

pCsRevsg143

Das Plasmid pCsRevsg143 kodiert für ein RevGFP-Fusionsprotein. Die Sequenzen von Rev und GFP sind durch eine Gly-Ala-Gly Hinge-Region verbunden. Die Expression wird durch den CMV immediate early Promotor kontrolliert. Die Rev-Sequenz stammt aus dem HIV-Isolat HXB2, wobei in der 5'-Region eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NheI eingefügt wurde, so daß sRev ein zusätzliches Serin enthält (Aminosäure-Sequenz: MASAGR... statt MAGR...) (Neumann et al. 2001).

pFred

Vom eukaryontischen Expressionsplasmid pFred wird das grün fluoreszierenden Protein (GFP) unter der Kontrolle des CMV immediate early Promotors exprimiert. Es handelt sich dabei um eine GFP-Variante („GFPsg143“ basierend auf GFPsg25) mit stark erhöhter Fluoreszenzintensität gegenüber der ursprünglich aus *Aequorea victoria* isolierten GFP-Sequenz (Stauber et al. 1998).

pCsRevYFP

Dieses Plasmid codiert für die Expression eines Fusionsproteins aus Rev und dem gelb fluoreszierenden Protein YFP unter der Kontrolle des CMV immediate early Promotors.

pSV40-CFP

Das Plasmid pSV40-CFP stellt ein eukaryontisches Expressionsplasmid für das cyan fluoreszierende Protein CFP unter der Kontrolle des SV40 Promotors dar.

Im Verlauf dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pBT-Rev

Das Plasmid pBT-Rev stellt das Rev-Expressionsplasmid im Bait-Kontext für das bakterielle Zwei-Hybrid-System BacterioMatch dar, siehe 2.3. Die Rev-Sequenz wurde aus dem Plasmid pCsRevsg143 per PCR amplifiziert und über die eingefügten Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme NotI (5') und EcoRI (3') in den Vektor pBT des BacterioMatch-Systems eingefügt. Bei der PCR Amplifikation wurden außerdem zwei Stop-Codons (TAA und TGA) an das 3'-Ende der Rev Sequenz angefügt.

pBT-NtRev, pBT-CtRev, pBT-Rev11-69 und pBT-Rev 1-75

Diese Plasmide codieren für die Rev-Fragmente mit den Aminosäuren 1-54 („NtRev“), 54-116 („CtRev“), 11-69 und 1-75 im Bait-Kontext für das bakterielle Zwei-Hybrid-System BacterioMatch, siehe 2.3. Die Rev-Sequenzen wurden wie beim Plasmid pBT-Rev beschrieben (s.o.) per PCR amplifiziert und in pBT eingefügt.

pTRG-Rev

Das Plasmid pTRG-Rev stellt das Rev-Expressionsplasmid im Target-Kontext für das bakterielle Zwei-Hybrid-System BacterioMatch dar, siehe 2.3. Die Konstruktion dieses Plasmids erfolgte analog zu der des pBT-Rev Plasmids (s.o.).

pTRG-GST A4

Dieses Plasmid stellt das Expressionsplasmid für GST A4, das zelluläre Protein voller Länge von B1-1, im Target-Kontext für das bakterielle Zwei-Hybrid-System BacterioMatch dar, siehe 2.3. Es wurde konstruiert, indem die B1-1 Sequenz aus dem pTRG-B1-1 Plasmid aus der cDNA (2.3.3) per PCR in zwei sequentiellen Schritten amplifiziert wurde und dabei die in B1-1 fehlenden Sequenzen, die für die ersten 41 Aminosäuren codieren, über synthetische Oligonukleotide angefügt wurden. Die so konstruierte GST A4 Sequenz wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI in pTRG eingefügt.

pTRG-VPS 28

Dieses Plasmid stellt das Expressionsplasmid für VPS 28, das zelluläre Protein voller Länge von B2-92, im Target-Kontext für das bakterielle Zwei-Hybrid-System BacterioMatch dar, siehe 2.3. Es wurde analog zu pTRG-GST A4 konstruiert. So wurde in pTRG-VPS 28 die B2-92 Sequenz aus dem pTRG-B2-92 Plasmid aus der cDNA (2.3.3) per PCR amplifiziert und dabei die in B2-92 fehlenden Sequenzen, die für die ersten 16 Aminosäuren codieren, über synthetische Oligonukleotide angefügt.

pC-B1-1-GFP, pC-GST A4-GFP, pC-B2-92-GFP und pC-VPS 28-GFP

Diese Plasmide exprimieren B1-1 bzw. GST A4 bzw. B2-92 bzw. VPS 28 jeweils als Fusionsproteine mit GFP unter der Kontrolle des CMV immediate early Promotors.

pC-B1-1-his, pC-GST A4-his, pC-B2-92-his und pC-VPS 28-his

Diese Plasmide exprimieren B1-1 bzw. GST A4 bzw. B2-92 bzw. VPS 28 an deren 3'-Sequenz jeweils ein His-Tag aus 6 Histidinen angehängt wurde. Promotor ist der CMV immediate early Promotor.

pC-Rev-his

Dieses Plasmid exprimiert Rev an dessen 3'-Sequenz jeweils ein His-Tag aus 6 Histidinen angehängt wurde unter der Kontrolle des CMV immediate early Promotors. Die Rev-Sequenz stammt aus dem Plasmid pCsRevsg143.

pSV40-B1-1-CFP, pSV40-B2-92-CFP, pSV40-GST A4-CFP und pSV40-VPS 28-CFP:

Diese Plasmide codieren für die Expression der neu identifizierten Rev-Interaktoren B1-1 und B2-92 und deren zugehörige Proteine voller Länge GST A4 bzw. VPS 28 jeweils als Fusionsproteine mit dem cyan fluoreszierenden Protein CFP unter Kontrolle des SV40 Promotors.

Die Sequenzen aller PCR-Produkte wurden durch Sequenzierungen verifiziert.

2.1.9 Zellen

2.1.9.1 Bakterielle Zellen

***E. coli* Epicurian Coli SoloPack Gold superkompetente und ultra-kompetente Zellen (Stratagene)**

Diese Zellen sind ein Derivat von XL10-Zellen, deren Gene für die Rekombinase RecA und die Endonuclease EndA1 deletiert wurden, so daß einklonierten DNA-Sequenzen stabil behalten werden. Außerdem fehlen diesem Stamm die McrA, McrCB und McrF Restriktions-Systeme, so daß einklonierte methylierte DNA nicht geschnitten wird. Für besonders schwierige Klonierungen wurden ultra-kompetente Zellen benutzt, sonst superkompetente Zellen.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZ M15 Tn10* (Tet^r)]

XL1-Blue MRF' Kan Zellen (Stratagene)

Dieser Bakterienstamm wurde für die Klonierung der pBT- und pTRG-Plasmide verwendet. Er ist ein Kanamycin-resistentes Derivat des XL1-Blue Stammes und geeignet für Transformationen mit Plasmiden, die Chloramphenicol-Resistenz (wie pBT-Plasmide) oder Tetracyclin-Resistenz (wie pTRG-Plasmide) tragen. Darüber hinaus trägt dieser Stamm Mutationen in den Genen für das Restriktions-System [(*mcrA*)183, □(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173], der Endonuklease (*endA*) und Rekombinase (*recA*). Die *hsdR* Mutation verhindert, daß inklonierte DNA durch das EcoK Endonuklease-System geschnitten wird. Die Gene für die Kanamycin-Resistenz sowie für den *lac*-Repressor LacI^q befinden sich auf einem F'-Episom. Dieser Bakterienstamm sowie die anderen im BacterioMatch verwendeten Stämme trägt die *supE44* Mutation, die als Suppressor des Amber-Stop-Codons wirkt, so daß TAG Stop-Codons teilweise mit dem Einbau von Glutamin überlesen werden. Diesem Umstand wurde bei den Klonierungen Rechnung getragen und kein Amber-Stop-Codon verwendet.

Genotyp: (*mcrA*)183 (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZ M15 Tn5* (Kan^r)]

BacterioMatch I Two-Hybrid-System Reporter Strain Competent Cells (Stratagene) (kurz: BMI Reporter Zellen)

Dieser Bakterienstamm enthält das Reportersystem für das BacterioMatch I System, nämlich die Reportergene für β -Lactamase und β -Galactosidase (siehe 2.3.1). Diese Reportergene befinden sich zusammen mit lacI^q auf einem F' Episom. Der Promotor der Reporter-kassette ist ein modifizierter *lac* Promotor und enthält einen einzelnen Operator (OR2), der sich an Position -62 befindet und die CRP-Bindesequenz, die sich dort ursprünglich beim *lac* Promotor befindet, ersetzt (Dove et al. 1997; Joung et al. 2000; Dove und Hochschild 1998). Dieser modifizierte *lac* Promotor ist nicht induzierbar durch IPTG! Oberhalb der Reporter-kassette befindet sich das Shine-Dalgarno Translations-Signal. Dieser Bakterienstamm stammt von XL-1 Blue MRF' Zellen (siehe oben) ab.

Genotyp: (*mcrA*)183 (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *laqI^q bla lacZ Kan^r*]

BacterioMatch II Screening Reporter Competent Cells (Stratagene)

Dieser Bakterienstamm enthält das Reportersystem für das BacterioMatch II System, nämlich die Reportergene *HIS3* und *aadA*, siehe 2.3.2. Die Bakterienzellen sind auxotroph für Histidin. Das *HIS3* Genprodukt codiert für eine Komponente im Histidin-Stoffwechselweg und kann eine *hisB* Mutation im Reporterstamm komplementieren. Auf diese Weise kann dieser Stamm bei Expression des *HIS3* Reportergens in Medium wachsen, das 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) enthält, welches als kompetitiver Inhibitor auf das *HIS3* Genprodukt wirkt. Das *HIS3* Genprodukt wird von der Reporter-kassette auch ohne transkriptionelle Aktivierung (Interaktion von Bait und Target) auf niedrigem Niveau basal exprimiert und erlaubt daher Wachstum in Histidin-Mangelmedium ohne 3-AT (M9

His DO Medium). Das *aadA* Reporter gen codiert für eine Streptomycin-Resistenz. Ansonsten entspricht dieser Bakterienstamm dem der BMI Reporter Zellen (siehe oben). Genotyp: (*mcrA*)183 (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 hisB supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *laqI^q HIS3 aadA Kan^r*]

2.1.9.2 Humane Zellen

HeLa

Epitheloide Zellen eines Cervix-Karzinoms. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (CRL-7923).

2.1.10 Geräte

Name / Hersteller

• 14 ml Rundboden-Gefäßen (Falcon, BD)
• Costar 25 cm ² Cell Culture Flask (Corning Inc., Corning, NY, USA)
• Falcon EASY GRIP Tissue Culture Dish, 35 x 10 mm (Becton Dickinson, USA)
• Filterpapier, extra thick, 7,5 x 10 cm (BioRad)
• Gel-Dokumentationssystem Chemidoc (Biorad)
• Gene Pulser / E. coli Pulser Cuvettes, 0,1 cm electrode gap (Bio-Rad)
• Hamilton Spritze (Hamilton Company, Reno, Nevada, USA)
• Hettich Rotanta Zentrifuge
• Hettich Rotixa Zentrifuge
• Infors Schüttelinkubator
• Microplate Reader Model 3550-UV (Bio-Rad)
• Mikroskop: Cell Observer (Carl Zeiss, Göttingen) mit Zeiss Axiovert 200M research microscope, Temperatur und CO ₂ -Gehalt der Inkubationskammer einstellbar; angesteuert mit AxioVision 4 Software auf einer Fujitsu Siemens Celsius Workstation; Filter-sets: CFP: Zeiss No. 47 (BP436/20 FT 455 BP480/40), YFP: Zeiss No. 46 (BP500/20 FT 515 BP535/30), GFP „Sg143GFP“ (BP 475/40 FT 500 BP 530/50) ; Bilder wurden aufgenommen mit einer AxioCam 14 Bit CCD Kamera
• Minisart 0,20 µm Filter (Sartorius)
• Minisart 0,45 µm Filter (Sartorius)
• Multiflex Round Tips 0,5 - 200 µl (Sorenson Bio Science, Inc.)
• Nunc Cryo Tube Vials (Nalge Nunc International, Dänemark)
• Nunc p35 Zellkulturschälchen mit 14 mm (Durchmesser) Glasboden (Mattek Corp., Ashland, USA)

- Nunc Solo Flask 185 cm² (Nalge Nunc International, USA)
- PCR-Maschine Mastercycler gradient (Eppendorf)
- Plattenleser Fluoroskan Ascent (Thermo LabSystems, Helsinki, Finnland)
- Stericup 0,22 µm GP Express, 500 ml (Millipore Corporation, Bedford, USA)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf)
- Trans-Blot Transfer Medium, Pure Nitrocellulose Membrane, 0,2 µm (BioRad)
- Transilluminator 312 nm (Bachofer)
- Zählkammer (Madaus Diagnostics, Köln)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die hier beschriebenen Techniken zur Isolierung der Plasmid-DNA basieren auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979).

2.2.1.1.1 *Plasmid-DNA-Mini-Präparation*

Bei Klonierungs-Prozessen wurden positive Klone durch Restriktionsanalysen von Plasmid-DNA, die aus Plasmid-DNA-Mini-Präparation gewonnen wurde, identifiziert. Zu diesem Zweck wurden einzelne Kolonien von der Agarplatte gepickt und bei high-copy-Plasmiden in ca. 2 ml Medium, bei low-copy-Plasmiden in ca. 10 ml Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator hochgezogen. Bei BMI-Zellen wurden die Bakterien statt dessen bei 30 °C inkubiert und je nach Bedarf für bis zu 36 Stunden wachsen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien der 2ml-Ansätze durch Zentrifugation für 20 Minuten in der Eppendorf-Tischzentrifuge bei 14000 rpm pelletiert – die 10 ml-Ansätze wurden durch Zentrifugation für zehn Minuten in der Hettich Rotanta Zentrifuge bei 4500 rpm pelletiert. Für die Untersuchung einer größeren Anzahl Plasmide (bei in der Regel mehr als 12 Ansätzen) wurde die Plasmid-DNA-Mini-Präparation im 96-Lochplatten-Format durchgeführt. Dazu wurde das Bakterienpellet mit 200 µl Puffer P1 (mit RNase) eines Plasmid Mini, Midi, Maxi oder Mega Kits von QIAGEN gründlich resuspendiert und anschließend je 200 µl Puffer P2 zugegeben, durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Dann wurden 200 µl kalter Puffer P3 zugegeben, durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und für mindestens zehn Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte

eine Zentrifugation für 40 Minuten in der Eppendorf-Tischzentrifuge bei 14 000 rpm. Der Überstand, der die Plasmide enthielt, wurde in ein neues Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 400 µl Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 14000 rpm wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit je 500 µl 80 % Ethanol gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation für fünf Minuten bei 14000 rpm, der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur im offenen Gefäß getrocknet. Die DNA wurde dann je nach gewünschter Konzentration in je 50 bis 100 µl Wasser gelöst. Die nach dieser Methode präparierte DNA ist nicht sehr rein und eignet sich nicht für Sequenzierungen und nur bedingt für weitere Klonierungsschritte.

Um saubere Plasmid-DNA zu erhalten oder bei einer kleinen Anzahl an Proben (in der Regel weniger als 12) wurde die DNA über Anionen-Austauscher-Säulchen mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits von Macherey Nagel gereinigt. Dazu wurden die Bakterienpellets (s.o.) in 250 µl Puffer A1 (mit RNase) resuspendiert und die Bakterienzellen durch Zugabe von 250 µl Puffer A2 lysiert. Die Gefäße wurden zum Mischen einige Male invertiert und maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Lyse durch Zugabe von 300 µl kaltem Puffer A3 gestoppt, und die Gefäße wurden wieder einige Male invertiert. Anschließend wurde für mindestens 10 Minuten bei 14 000 g zentrifugiert und der Überstand mit der darin befindlichen Plasmid-DNA auf ein Säulchen (NucleoSpin Plasmid column) gegeben. Das Säulchen wurde dann bei 11000 g für eine Minute zentrifugiert. Die Silica-Membran des Säulchens mit der adsorbierten DNA wurde dann gewaschen, indem 600 µl Puffer A4 zugegeben wurden und erneut für eine Minute bei 11000 g zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Säulchen leer für zwei Minuten bei 11000 g zentrifugiert und damit getrocknet, um den im Puffer A4 enthaltenen Ethanol vollständig zu entfernen. Zum Schluß wurde die DNA vom Säulchen eluiert, indem 50 µl Puffer AE zugegeben wurden und für eine Minute bei 11000 g zentrifugiert wurde. Die Sauberkeit der auf diese Art gewonnenen Plasmid-DNA reichte für Sequenzierungen aus.

2.2.1.1.2 Plasmid-DNA-Maxi-Präparation

Zur Isolierung größerer Mengen an reiner Plasmid-DNA wurde die Plasmid-DNA-Maxi-Präparation mit Hilfe des NucleoBond PC 500 Kits von Macherey Nagel durchgeführt. Zunächst wurde ein Verdünnungsausstrich der Bakterien, die das zu präparierende Plasmid enthielten, auf einer Agarplatte angefertigt. Von einer einzelnen Kolonie wurden ca. 3 ml Medium als Vorkultur angeimpft und für ca. acht Stunden bei 250 rpm geschüttelt. Damit wurde die Hauptkultur von 300 ml (high-copy-Plasmide) bzw. von 500 ml (low-copy-Plasmide) in einem 2 l Schikanekolben angeimpft und über Nacht bei 100 rpm geschüttelt. Die Inkubations-Temperaturen betragen 37 °C bzw. für pBT- und pTRG-Plasmide 30 °C. Anschließend wurden die Bakterien durch 20minütige Zentrifugation bei ca. 4000 g und 4 °C in der Hettich Rotixa Zentrifuge pelletiert. Im folgenden ist die Vorgehensweise für high-copy-Plasmide beschrieben. Das Pellet wurde mit 12 ml Puffer

S1 (mit RNase) gründlich resuspendiert. Nach Zugabe von 12 ml Lyse-Puffer S2 wurde durch Invertieren gemischt und anschließend fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Lyse durch Zugabe von 12 ml kaltem Puffer S3 gestoppt, der Behälter wiederum durch Invertieren gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Bakterienzellen filtriert und das Filtrat auf eine äquilibrierte AX 500 Säule gegeben. Die Säule wurde mit insgesamt 32 ml Puffer N3 gewaschen und die DNA dann mit 15 ml Puffer N5 eluiert. Aus dem Eluat wurde die DNA durch Zugabe von 11 ml Isopropanol gefällt und durch 40minütige Zentrifugation bei 4500 rpm und 4 °C in der Hettich Rotanta Zentrifuge pelletiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und wiederum für 20 Minuten bei 4500 rpm und Raumtemperatur in der Hettich Rotanta Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur inkubiert bis es trocken war. Die so gewonnene DNA wurde je nach gewünschter Konzentration in 200 µl bis 1 ml TE-Puffer aufgenommen. Schließlich wurde die Konzentration und Reinheit der DNA photometrisch bestimmt (siehe 2.2.1.2). Zur Präparation von low-copy-Plasmiden wurden doppelte Mengen der Puffer S1, S2 und S3 verwendet. Ansonsten war die Vorgehensweise identisch zur Isolierung von high-copy-Plasmid-DNA, falls nicht anders vermerkt.

2.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch aus einer 1:100-Verdünnung. Nach Sambrook et al. (1989) entspricht eine OD(260) von 1 einer Konzentration von 0,05 µg/µl an doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis OD(260)/OD(280) gibt die Reinheit der DNA an. Ein Wert > 1,7 ist dabei anzustreben.

2.2.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der NucleoSpin Extract Kit von Macherey Nagel verwendet. Zunächst wurde die DNA wie gewünscht mit Restriktionsenzymen geschnitten. Eine DNA-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid im Agarosegel und Laufpuffer wurde dann durchgeführt. Die interessierende DNA-Bande wurde anschließend durch kurze Beleuchtung mit einem Transilluminator (312 nm) sichtbar gemacht und aus dem Gel mit einem Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen und pro 100 mg Gewicht 400 µl Puffer NT2 zugegeben. Das Gel wurde durch 10minütige Inkubation in einem schüttelnden Heizblock bei 50 °C aufgelöst. Anschließend wurde die Probe auf ein Säulchen (NucleoSpin Extract column) gegeben und für eine Minute bei 11000 g zentrifugiert. Die Silica-Membran des Säulchens mit der

gebundenen DNA wurde dann gewaschen, indem 600 µl Puffer NT3 zugegeben wurden und erneut für eine Minute bei 11000 g zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Säulchen ein zweites Mal mit 200 µl Puffer NT3 gewaschen und diesmal für zwei Minuten bei 11000 g zentrifugiert, um den im Puffer NT3 enthaltenen Ethanol vollständig zu entfernen. Zum Schluß wurde die DNA vom Säulchen eluiert, indem 25 bis 50 µl Wasser oder TE zugegeben wurden und für eine Minute bei 11000 g zentrifugiert wurde. Mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kit von Macherey Nagel wurden auch PCR Produkte aufgereinigt. Dazu wurde nach erfolgter PCR ein Teil der Reaktion für die Aufreinigung eingesetzt (bei einem 50 µl PCR-Ansatz meist 25 µl). Das Volumen wurde mit TE-Puffer auf 50 µl gebracht und 200 µl Puffer NT2 zugegeben. Dann wurde weiterhin so verfahren, wie oben nach der Inkubation im Heizblock beschrieben.

2.2.1.4 Ligationen

Um zwei DNA-Fragmente (Insert und Vektor) mit kompatiblen Enden miteinander zu verbinden, wurde der Rapid Ligation Kit von Roche benutzt. Falls dabei der Vektor mit sich selbst kompatible überhängende Enden aufwies, wurde das 5'-Phosphat-Ende des Vektors dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern und die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme des Inserts zu erhöhen. Dazu wurde die Shrimp alkalische Phosphatase (Roche) benutzt, siehe 2.2.1.5. Für die Ligation wurde ein molares Verhältnis Insert:Vektor von 3:1 angestrebt – bei sog. blunt-end-Ligationen ein molares Verhältnis Insert:Vektor von 5:1. Die hierfür einzusetzenden Volumina wurden vorher durch Auftrag eines Aliquots von Vektor und Insert auf ein Agarosegel anhand der relativen Bandenintensitäten unter Berücksichtigung der Größenverhältnisse ermittelt. Insert und Vektor wurden gemischt, die entsprechende Menge 5x DNA dilution Puffer zugegeben und der Rest mit Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde die entsprechende Menge 2x T4 Ligase Puffer zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur für 5 bis 30 Minuten inkubiert. Dieser Ansatz konnte direkt für Transformationen eingesetzt werden. Für Elektroporationen wurden maximal 1/10 des Volumens des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA

Um Religationen von Vektoren zu verhindern, wurde vor der Ligation das 5'-Phosphat-Ende des Vektors dephosphoryliert. Dazu wurde die Shrimp alkalische Phosphatase (Roche) verwendet, die gegenüber der sonst häufig verwendeten alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm den Vorteil hat, daß sie durch Erhitzen auf 65 °C für 15 Minuten irreversibel inaktiviert wird und daher für den Ligationsansatz nicht entfernt werden muß. Für die Dephosphorylierung wurde nach dem Restriktionsverdau das Restriktionsenzym

durch Hitze nach Angaben des Herstellers inaktiviert. Dann wurde in den Restriktionsansatz die entsprechende Menge 10x Dephosphorylierungspuffer und 1 unit Shrimp alkalische Phosphatase gegeben und 30 Minuten bis 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase durch Inkubation bei 65 °C für 15 Minuten.

2.2.1.6 Klonieren mit dem BD In-Fusion PCR Cloning Kit

Der BD In-Fusion PCR Cloning Kit erlaubt das Einklonieren von PCR-Produkten in beliebige Vektoren ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen. Die Vektoren müssen dazu in linearisiertem Zustand vorliegen. Bei der PCR werden durch Wahl entsprechender 5'- und 3'-Primer an das Amplifikat Sequenzen mit jeweils 15 bp Homologie zu den linearisierten Enden des Vektors erzeugt. Über homologe Rekombination vermittelt des sogenannten „BD In-Fusion enzyme“ wird das Amplifikat in den Vektor eingefügt, siehe Abbildung 8. Diese Methode der Klonierung eignet sich besonders, wenn zum Einklonieren des Amplifikats keine geeigneten Restriktionsenzyme gefunden werden können (z.B. bei Vorhandensein der Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym mitten im PCR-Amplifikat) oder wenn ein PCR-Produkt gleichzeitig in zwei verschiedene Vektoren einkloniert werden soll – einmal mit Restriktionsenzymen und einmal über homologe Rekombination.

Der Vektor, in den das PCR-Produkt einkloniert werden soll, wurde zunächst mit einem Restriktionsenzym in der Nähe der gewünschten Insertionsstelle geschnitten, und der Vektor somit linearisiert. Anschließend wurde die Vektor-DNA über ein Ionenaustauscher-Säulchen isoliert, siehe 2.2.1.3. Es wurde eine PCR der einzuklonierenden DNA-Sequenz durchgeführt, wobei nach Angaben von BD Clontech Primer mit 15 bp Homologie zu den Enden des linearisierten Vektors benutzt wurden. Nach der PCR wurde das PCR-Produkt wie in 2.2.1.3 beschrieben gereinigt. PCR-Produkt und linearisierter Vektor wurden anschließend im molaren Verhältnis von 2:1 in insgesamt 10 µl gemischt. Diese 10 µl wurden dann zum „BD In-Fusion Enzyme Concentrate“ gegeben, gemischt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß auf Eis transferiert, und es folgte die Transformation der mitgelieferten kompetenten Zellen. Dazu wurden BD Fusion-Blue Competent Cells auf Eis aufgetaut und 2,5 µl der mit 40 µl TE-Puffer verdünnten BD In-Fusion Reaktion zugegeben. Die Zellen wurden nach 30minütiger Inkubation auf Eis einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden ausgesetzt. Nach einer Inkubation auf Eis für eine Minute wurden 450 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterienzellen bei 37 °C für eine Stunde geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl und 250 µl auf LB-Agarplatten, die Ampicillin enthielten, ausplattiert und diese Agarplatten bei 37 °C inkubiert.

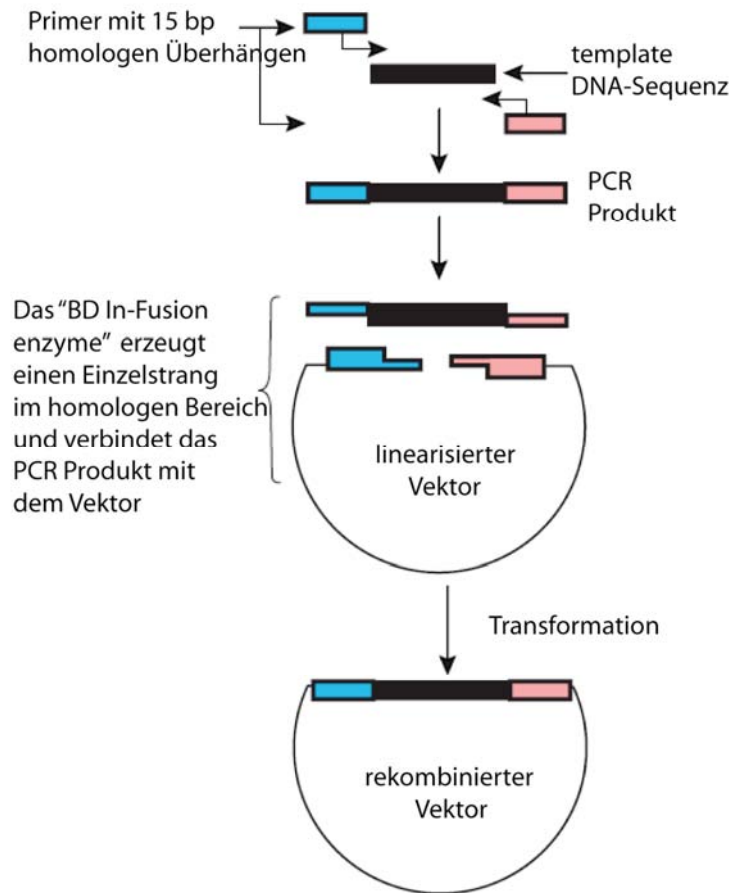


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs beim Klonieren mit dem BD In-Fusion PCR Cloning Kit. (Verändert nach BD Biosciences, Clontech)

2.2.1.7 Einfrieren von Bakterien

Bakterien wurden in Einfrier-Medium (siehe 2.1.3) konserviert. Das Einfriermedium wurde vor Verwendung sterilfiltriert. Um Bakterien von Plasmid-DNA-Maxipräparationen einzufrieren, wurden nach Wachstum der Hauptkultur 10 ml Bakteriensuspension abgenommen und bei 20 Minuten und 4 °C bei 4000 rpm in der Hettich Rotanta Zentrifuge pelletiert. Ansonsten wurden 10 ml Medium mit der zu konservierenden Kultur angeimpft, hochgezogen und pelletiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Nunc Cryo Tube Einfrierbehältern überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.8 Transformationen von Bakterienzellen mit Plasmiden

2.2.1.8.1 Elektroporation

Elektroporation ist eine Methode der Transformation prokaryotischer Zellen, bei der sehr hohe Transformations-Effizienzen erzielt werden können. Allerdings eignen sich Bakterienzellen, die mit einem Tetracyclin-Resistenz-Plasmid transformiert werden sollen, nicht für Elektroporation, da bei der Tetracyclin-Resistenz ein Ionenkanal in die Zellmembran eingebaut wird, mit dessen Hilfe Tetracyclin wieder aus der Zelle heraus transportiert wird. Bei Bakterienzellen, die elektroporiert wurden, kann dieser Ionenkanal nur mit sehr geringer Effizienz eingebaut werden (Sambrook et al. 1989). Elektroporation wurde mit den Bakterienstämmen XL10 und XL1-Blue MRF' Kan bei Transformation mit pBT-Plasmiden durchgeführt. Dazu wurden die Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und ca. 5 ng der Plasmid-DNA mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht. 50 µl Bakterienzellen wurden mit den 10 µl der Plasmid-Verdünnung gemischt. Nach Inkubation auf Eis für fünf Minuten oder länger wurden die mit Plasmid-Verdünnung gemischten Bakterien in eine vorgekühlte Gene Pulser / E. coli Pulser Küvette (Bio-Rad) überführt und einem Elektroschock mit Hilfe eines E. coli Pulser (Bio-Rad) bei 1,8 kV mit einer Zeitkonstanten von 4 bis 5 ms ausgesetzt. Sofort danach wurden 450 µl SOC-Medium zugegeben und XL10-Zellen für eine Stunde schüttelnd bei 37 °C inkubiert; XL1-Blue MRF' Kan Zellen wurden bei 30 °C für 1,5 Stunden inkubiert. Danach wurden jeweils 35 µl und 200 µl auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Platten mit XL10-Zellen wurden bei 37 °C, Platten mit XL1-Blue MRF' Kan Zellen bei 30 °C inkubiert.

2.2.1.8.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Das folgende Protokoll gibt die chemische Transformation von E. coli Epicurian Coli SoloPack Gold superkompetenten bzw. ultra-kompetenten Zellen wieder. Änderungen der Vorgehensweise für andere Bakterienstämme werden unten beschrieben.

Ein Gefäß mit Bakterienzellen wurde auf Eis aufgetaut und 1,7 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Das Gefäß wurde dann für zehn Minuten auf Eis inkubiert und zwischendurch alle zwei Minuten gedreht. Anschließend wurden maximal 50 ng an Plasmid-DNA zugegeben, durch Drehen gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterienzellen einem Hitzeschock bei 54 °C für eine Minute ausgesetzt, worauf die Zellen sofort wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt wurden. Dann wurden 150 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen für eine Stunde schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Aliquots der Bakteriensuspension auf Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Änderungen im Protokoll für superkompetente XL1-Blue MRF' Kan Zellen:

Es wurden 100 µl Bakterienzellen verwendet und in 14 ml Rundboden-Gefäßen (Falcon, BD) inkubiert. Die Dauer des Hitzeschocks betrug 45 Sekunden, und es wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben. Die Bakterienzellen wurden vor dem Ausplattieren für 1,5 Stunden bei 30 °C und die Agarplatten ebenfalls bei 30 °C inkubiert.

Weitere Änderungen im Protokoll für CaCl₂-kompetente XL1-Blue MRF' Kan Zellen:

Es wurden 150 µl Bakterienzellen verwendet. Die Dauer des Hitzeschocks betrug 90 Sekunden.

Änderungen im Protokoll für chemisch kompetente BMI-Zellen:

Es wurden jeweils 10 bis 50 ng pBT-Plasmid und pTRG-Plasmid zugegeben. Die Dauer des Hitzeschocks betrug 45 Sekunden. Die Bakterienzellen wurden vor dem Ausplattieren für 1,5 Stunden bei 30 °C inkubiert und die Agarplatten ebenfalls bei 30 °C inkubiert.

Änderungen im Protokoll für chemisch kompetente BMII-Zellen:

BMII-Zellen enthalten das *his3*-Gen als Reporter für eine Interaktion zwischen Bait und Target, siehe 2.3.2. Dieses Gen erlaubt Wachstum auf Histidin-Mangelmedium. Die Transformation von BMII-Zellen wurde in zwei Schritten durchgeführt: zuerst wurden die Zellen nach der Transformation in Vollmedium (LB-Medium) hochgezogen, damit die Antibiotika-Resistenzen exprimiert werden können; anschließend wurden die Bakterienzellen in das Histidin-Mangelmedium M9 His DO Medium transferiert.

Die Transformation folgt zunächst dem für BMI-Zellen angegebenen Protokoll, außer daß die Dauer des Hitzeschocks 35 Sekunden betrug. Nach der 1,5stündigen Inkubation bei 30 °C wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation bei 2000 g und 10 Minuten in der Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert. Um das Vollmedium möglichst quantitativ zu entfernen wurde das Bakterienpellet mit 1 ml M9 His DO Medium vorsichtig resuspendiert und erneut in gleicher Weise pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut vorsichtig mit 1 ml M9 His DO Medium resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden dann für 2 Stunden schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf entsprechenden Agarplatten mit Histidin-Mangelmedium ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.9 Herstellen kompetenter Bakterien

Aus Kostengründen wurden kompetente Zellen, wo es möglich war, selbst hergestellt, und zwar XL1-Blue MRF' Kan-Zellen und XL10-Zellen. Diese Zellen wurden für Klonie-

rungen verwendet. Bakterienzellen des BacterioMatch-Systems (BMI- und BMII-Zellen) wurden aus Gründen der Reproduzierbarkeit stets kompetent käuflich erworben.

2.2.1.9.1 Herstellen elektrokompetenter Bakterien

Zunächst wurde eine Impföse der Bakterien auf einer Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Dann wurde eine Kolonie gepickt, mit dieser eine 10 ml Vorkultur angeimpft und schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde dann die 1 Liter-Hauptkultur angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert, bis eine OD(600) von ca. 0,7 erreicht wurde, bei der sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Bakteriensuspension wurde danach sofort für 30 Minuten auf Eis gestellt und anschließend durch 20minütige Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Bakterienpellet in einem Liter kaltem Milli-Q resuspendiert. Danach wurden die Bakterien durch eine erneute Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde dann in 500 ml Milli-Q resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dann wurde das daraus resultierende Pellet mit 20 ml vorgekühltem 10 % Glycerin in Milli-Q resuspendiert und erneut zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 3 ml vorgekühltem 10 % Glycerin in Milli-Q homogenisiert und in Aliquots gewünschter Größe aufgeteilt. Die auf diese Weise hergestellten elektrokompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.1.9.2 Herstellen chemisch kompetenter Bakterien (CaCl₂)

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien mit CaCl₂ basiert auf der Methode nach Hanahan (Hanahan 1983).

Eine Impföse der Bakterien wurde auf einer Agarplatte ausgestrichen und diese bei 37 °C inkubiert. Dann wurde eine Kolonie gepickt, mit dieser eine 40 ml Vorkultur angeimpft und schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde dann die Hauptkultur von 400 ml 1:50 angeimpft. Die Bakterienzellen wurden weiter bei 37 °C inkubiert bis sie eine OD(600) von ca. 0,4 erreichten und damit am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase standen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 Minuten auf Eis gekühlt und dann bei 4000 rpm in der Hettich Rotixa Zentrifuge für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Medium wurde dann abgegossen und das Bakterienpellet in 100 ml einer vorgekühlten Lösung aus 80 mM MgCl₂ und 20 mM CaCl₂ resuspendiert. Anschließend wurde in der Hettich Rotanta Zentrifuge für 10 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde dann in 10 ml einer vorgekühlten Lösung aus 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und 350 µl DMSO zugegeben. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurden erneut 350 µl DMSO zugegeben, die Bakterienzellen zu 350 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis et al. 1992) wurde benutzt, um DNA-Sequenzen zu amplifizieren und gleichzeitig für Klonierungen benötigte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme einzufügen. Es wurde in der Regel die Herculase hotstart DNA Polymerase von Stratagene verwendet, die sich dadurch auszeichnet, daß sie eine besonders niedrige Fehlerrate (ca. 2,8 Fehler pro Zyklus pro Megabase – Shevchuk et al. (2004)) besitzt und auch lange und GC-reiche DNA-Sequenzen amplifizieren kann. Des weiteren ist die DNA-Polymerase komplexiert und wird beim ersten Erhitzen auf 94 °C freigesetzt („hotstart“), wodurch unspezifische Amplifikationen beim Hochheizen im ersten Zyklus vermieden werden. Die als Primer dienenden Oligonucleotide wurden mit 10 mM Tris auf eine Konzentration von je 20 µM gebracht. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle ohne DNA-template mit angesetzt, um die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen. In das PCR-Gefäß wurden 5 µl 10 x Herculase Puffer, 8 µl des dNTP-Mixes, 1 bis 5 ng der zu amplifizierenden DNA-Sequenz („template“), je 2,5 µl der Primer und 0,5 bis 0,7 µl Herculase hotstart DNA Polymerase pipettiert. Zuvor wurde die entsprechende Menge Wasser für ein Gesamtvolumen von 50 µl vorgelegt. Im folgenden ist ein Standard-Programm für die PCR angegeben, das je nach Bedarf abgeändert wurde:

94 °C	2 Minuten	25 Zyklen
94 °C	30 Sekunden	
55 bis 60 °C (sollte ca. $T_m - 5$ °C sein)	30 Sekunden	
72 °C	pro kb 1 Minute	
72 °C	7 Minuten	
4 °C	unbegrenzt	

Der Erfolg der PCR wurde durch Auftrag eines Aliquots des Amplifikats auf ein Agarosegel überprüft. Das PCR-Produkt wurde anschließend für die Klonierung in Vektoren vorbereitet. Dazu wurde zunächst die DNA mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits von Macherey Nagel (siehe 2.2.1.3) isoliert. Dann wurde das Amplifikat mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Beim Design der Primer für die PCR wurde darauf geachtet, daß die verwendeten Restriktionsenzyme effektiv am Ende von DNA-Fragmenten schneiden (Moreira und Noren 1995) und entsprechend lange Überhänge (clamp) verwendet.

2.2.1.11 Restriktionsverdau

Bei analytischen Restriktionsverdau kann anhand des resultierenden Bandenmuster die Integrität von Plasmiden überprüft werden und es können bei Klonierungen positive Kolonien identifiziert werden. Dazu wurden jeweils maximal 1 µg DNA bzw. bei Plasmid-DNA-Minipräps 5 bis 15 µl DNA, 2 µl Puffer für das Restriktionsenzym, bei Bedarf 100 µg/ml BSA (Endkonzentration) und ca. 0,5 bis 0,7 units des Restriktionsenzym eingesetzt. Der Ansatz wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Der Verdau erfolgte bei der für die volle Aktivität der Enzyme nötigen Temperatur (meist 37 °C) für mindestens 1,5 Stunden. Bei präparativen Verdau wurden mindestens 1,5 µg DNA und mindestens 1 unit des Restriktionsenzym eingesetzt. Der Verdau wurde für mindestens 2 Stunden bei optimaler Temperatur inkubiert. Bei einem gleichzeitigen Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen wurde darauf geachtet, daß beide volle Aktivität in demselben Puffer besitzen. Bei der Auswahl der Restriktionsenzyme für analytische Verdau wurde dieser Umstand berücksichtigt. Falls es nicht möglich war, einen gemeinsamen Puffer für beide Restriktionsenzyme zu finden, wurde der Verdau zuerst mit dem Enzym durchgeführt, dessen Puffer eine geringere Salzkonzentration besitzt. Anschließend wurde der Puffer des anderen Enzyms im Überschuß zugegeben und dann das zweite Restriktionsenzym. Es wurde dabei darauf geachtet, daß das erste Enzym in dem Puffer des zweiten Enzyms keine unspezifische Aktivität („star activity“) erlangt. In solchen Fällen wurde vor Zugabe des zweiten Enzyms das erste Enzym hitzeinaktiviert. Falls dies bei dem benutzten Enzym nicht möglich war, wurde die DNA für das zweite Restriktionsenzym umgepuffert, indem die DNA mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits von Macherey Nagel isoliert wurde (siehe 2.2.1.3, Vorgehensweise analog zur Aufreinigung von PCR-Produkten) und in einer für das zweite Restriktionsenzym geeigneten Pufferlösung aufgenommen wurde. Anschließend erfolgte der Verdau mit dem zweiten Restriktionsenzym.

2.2.1.12 Gelelektrophorese von DNA

Die Konzentration der Agarosegele für die Gelelektrophorese von DNA wurde passend zu der zu erwartenden DNA-Fragmentgröße gewählt. Meist wurde ein 1 % Agarosegel verwendet. Damit sind nach eigenen Erfahrungen Fragmente der Größen von 500 bp bis 3 kb gut zu erkennen und zu unterscheiden. Analytische Restriktionsverdau wurden daher so gewählt, daß sie möglichst Fragmente in diesem Größenbereich erzeugten. Die Laufstrecke eines DNA-Fragments ist indirekt proportional zum Logarithmus seiner Größe. Daher werden kleinere Fragmente stärker aufgetrennt als größere. Andererseits werden kleinere Fragmente durch Ethidiumbromid schwächer angefärbt. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unter 1 kb wurden Gele mit bis zu 2 % Agarose verwendet. Für Fragmentgrößen deutlich oberhalb von 3 kb wurde die Agarose-Konzentration bis auf 0,65 % gesenkt.

2.2.2 Techniken zur Analyse von Proteinen

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt basierend auf der Methodik von Laemmli (Burnette 1981).

Für eine SDS-PAGE aus Bakterien wurden die Bakterien zur Expression der interessierenden Proteine induziert (z.B. mit IPTG zur Expression der Bait- und Target-Proteine) und nach einer angemessenen Zeit geerntet. Damit verschiedene Ansätze jeweils ungefähr gleich viele Bakterien enthielten, wurde die OD(600) gemessen und jeweils immer auf einen OD(600)-Wert von 1,6 in insgesamt 1,6 ml verdünnt. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugieren bei 14000 g für 15 Minuten in der Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert und das Pellet mit Westernblot-Puffer für bakterielle Zellen (siehe 2.1.2) resuspendiert. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, damit die Benzozase störende Nukleinsäuren beseitigt. Dann wurden die Proben mit 4xLDS Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und dann für spätere Verwendung eingefroren bzw. gleich der SDS-PAGE unterzogen.

Humane Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschälchen ausgesät und geerntet, wenn die Zellen fast konfluent waren. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 500 µl Puffer derselben Zusammensetzung wie Co-IP-Puffer (siehe 2.1.2) zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen abpipettiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 4xLDS Probenpuffer versetzt. Nach 5minütigem Erhitzen bei 95 °C wurden die Proben eingefroren bzw. weiter für die SDS-PAGE verwendet.

Unmittelbar vor der Gelelektrophorese wurden eingefrorene Proben erneut für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und danach auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei ca. 14000 g in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu pelletieren. Alle Gelelektrophoresen wurde mit 4-12 % Bis-Tris Gradientengelen (NuPAGE) durchgeführt. Es wurden jeweils ca. 20 µl Probe und ca. 12 µl Proteinmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte immer in MES Laufpuffer und wurde zunächst bei 30 mA durchgeführt, bis die Proben in das Trenngel einzulaufen begannen. Dann wurde die Stromstärke auf 50 mA erhöht. Die SDS-PAGE wurde beendet, sobald die blaue Front der Proben den unteren Rand des Gels erreichte.

2.2.2.2 Westernblot

Beim Westernblot wird das im Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteinmuster auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dazu wurde zunächst eine auf passende Größe zurechtgeschnittene Nitrozellulose-Membran für ca. 5 Minuten in Transferpuffer gelegt. Ebenso wurde das Polyacrylamidgel nach dem Lauf für ca. 5 Minuten in einem separaten Gefäß in Transferpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte der Blot nach dem Semi-Dry-

Verfahren. Auf die Anodenplatte (+) wurden zwei Lagen Filterpapier und die Nitrozellulose-Membran gegeben und mit Transferpuffer befeuchtet. Das Gel wurde vorsichtig über die Nitrozellulose-Membran gelegt. Darauf wurden wiederum zwei Lagen mit Transferpuffer befeuchtetes Filterpapier gegeben. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden mit einer Glaspipette vorsichtig herausgewalzt. Zuoberst wurde die mit Transferpuffer befeuchtete Kathodenplatte (-) aufgesetzt. Der Blot erfolgte für ein Gel bei 90 mA, für zwei Gele bei 180 mA. Die Spannung wurde zum Schutz der Graphitplatten auf 25 V begrenzt. Nach 90 Minuten wurde der Blot beendet. Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran über Nacht bei 4 °C in einer Lösung aus 20 % Milch in PBS-T geblockt.

2.2.2.3 Nachweis von Proteinen durch Antikörper

Proteine wurden auf der Nitrozellulose-Membran durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Dazu wurde nach dem Blocken (s.o.) die Membran zunächst mit PBS-T gewaschen und mit dem Erstantikörper, der das interessierende Protein spezifisch erkannte, inkubiert. Dabei wurde der Erstantikörper wie in 2.1.7 beschrieben in 10 % Milch in PBS-T verdünnt und die Nitrozellulose-Membran in der Regel für 2 Stunden in dieser Lösung geschwenkt. Anschließend wurde gründlich mit PBS-T gewaschen und die Membran für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Der zweite Antikörper stammte aus einer anderen Spezies und war gegen konstante Bereiche des Erstantikörpers gerichtet. Er diente zur Detektion und Verstärkung des Signals. Die Membran wurde erneut gewaschen. Dann erfolgte die Detektion durch Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham Pharmacia Biotech). Der Zweitantikörper war dazu mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, so daß nach Zugabe des Substrates eine Fluoreszenz-Reaktion stattfand. Dazu wurden gleiche Volumina der Substrat-Lösungen A und B auf die Membran gegeben und diese für fünf Minuten inkubiert. Überschüssige Lösung wurde danach abgetropft und die Nitrozellulose Membran sofort in das Geldoc Geldokumentationssystem (BioRad) gelegt. So konnten Aufnahmen der Chemilumineszenz mit unterschiedlichen Belichtungszeiten und der Nitrozellulose-Membran mit den Markerbanden angefertigt werden. Durch Überlagerung der Aufnahmen von Chemilumineszenz und Markerbanden mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms (Adobe Photoshop) konnten die Markerbanden genau eingezeichnet werden.

2.2.2.4 Entfernen gebundener Antikörper von der Nitrozellulose Membran (Strippen)

Wenn Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran nachfolgend mit anderen Antikörpern detektiert werden sollten, wurden die gebundenen Antikörper durch „Strippen“ der Membran entfernt. Dazu erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran in stripping

buffer (siehe 2.1.2) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran sehr gründlich mit PBS-T gewaschen und mit den neuen Antikörpern wie in 2.2.2.3 beschrieben inkubiert. Bei Bedarf wurde die gestrippte Membran mit ECL-Detektionsreagenz behandelt, um zu testen, ob die Antikörper durch das Strippen quantitativ entfernt wurden.

2.2.3 Zellkulturtechniken

2.2.3.1 Kultivierung und Aussaat humaner Zellen

Die humane Zelllinie HeLa (siehe 2.1.9.2) wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre inkubiert. Kultiviert wurden die Zellen in DMEM Medium mit Phenolrot, das mit 10 % (v/v) FKS und 1 % (v/v) Antibiotische/Antimykotische Lösung ergänzt wurde. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium umgesetzt und dabei 1:20 geteilt („Splitting“). Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung für 2 Minuten im Brutschrank inkubiert, um sie vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Mit der Zugabe von frischem Medium wurden restliche am Boden der Zellkulturflasche anheftende Zellen abgeschwemmt und gleichzeitig das Trypsin inaktiviert. Zur Aussaat der Zellen in Schälchen für Transfektionen wurden die Zellen, wie eben beschrieben, vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend wurden die in einem bestimmten Volumen der Zellsuspension befindlichen Zellen in einer Zählkammer (Madaus Diagnostics, Köln) unter dem Mikroskop gezählt und daraus die Zellzahl pro ml errechnet. HeLa-Zellen wurden dann zu ca. 1 bis $2 \cdot 10^5$ Zellen pro 35 mm Schälchen und ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen pro 10 cm Schälchen ausgesät.

2.2.3.2 Transfektion von HeLa-Zellen mit dem FuGENE 6 Transfektionsreagenz

HeLa-Zellen wurden mit Hilfe des FuGENE 6 Transfektionsreagenz (Roche) mit Plasmiden transfiziert. Für die Transfektionen wurden die Zellen, wie in 2.2.3.1 beschrieben, in Zellkulturschälchen ausgesät und im Brutschrank inkubiert, bis sie zu 50 bis 80 % konfluent waren. Für die Transfektion wurden serumfreies Medium und die benötigte Menge FuGENE 6 Transfektionsreagenz in einem Gesamtvolumen von 200 µl miteinander gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden pro µg DNA 2 bis 3 µl FuGENE 6 Transfektionsreagenz eingesetzt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA zugegeben, gemischt und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde diese Mischung über die Zellen im Zellkulturschälchen getropft. Die so behandelten Zellen wurden für mindestens einen weiteren Tag im Brutschrank

inkubiert. Bei Transfektion mit Expressionsplasmiden, die für fluoreszierende Proteine codierten, konnte die Transfektionseffizienz und Expression der interessierenden Proteine mikroskopisch verfolgt werden.

2.2.4 Mikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Cell Observer System (Carl Zeiss, Göttingen) durchgeführt (siehe 2.1.10). Bei Bedarf wurde das Medium der Zellen gegen phenolrot-freies Medium (siehe 2.1.4) ausgetauscht, um eventuell störende Einflüsse des Phenolrots auszuschließen. Für besonders hochauflösende Fluoreszenzaufnahmen wurde ein 63x Ölimmersionobjektiv verwendet. Dazu wurden die Zellen auf 35 mm Glasbodenschälchen (Mattek Corp., Ashland, MA) ausgesät. Die Zellkulturschälchen wurden vom Mikroskop-Tisch beheizt und befanden sich in einer Inkubationskammer, mit deren Hilfe die Temperatur bei 37 °C und der CO₂-Gehalt der wassergesättigten Luft bei 5 % konstant gehalten werden konnte. Anregungslicht eines bestimmten Wellenlängenbereichs wurde durch entsprechende Anregungsfilter mit enger Bandbreite erzeugt. Mit Hilfe eines 3-Bandpass Beamsplitters und eines Multi-Bandpaß Emissionsfilters konnten verschiedene Emissionswellenlängen detektiert werden. Digitale Bilder wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera aufgenommen.

Zur Untersuchung der Co-Lokalisation von Rev (als YFP-Fusion) und den neu identifizierten Rev-interagierenden Proteinen (jeweils als CFP-Fusion) (siehe 3.2.2.1) wurden jeweils Aufnahmen der Kanäle für das gelb fluoreszierende Protein YFP, cyan fluoreszierende Protein CFP und Phasenkontrast angefertigt. Um zu zeigen, daß die Kanäle YFP und CFP getrennt sind und nicht ineinander überstrahlen, wurden Aufnahmen angefertigt, bei denen jeweils nur ein fluoreszierendes Protein (entweder nur YFP oder nur CFP) eingesetzt wurde. Im jeweils anderen (leeren) Kanal wurde anschließend eine Fluoreszenzaufnahme angefertigt, deren Belichtungszeit deutlich höher war als bei allen Aufnahmen des in diesem Kanal fluoreszierenden Proteins. So konnte gezeigt werden, daß selbst bei starken Fluoreszenzsignalen ein Überstrahlen in den jeweils anderen Kanal nicht zu beobachten war. Außerdem wurde bei den Aufnahmen zur Co-Lokalisation die Focus-Ebene zwischen YFP- und CFP-Kanal nicht verändert.

2.2.5 β -Galactosidase-Assay

Im BacterioMatch I System (siehe 2.3.1) ist *lacZ* eines der Reportergene, so daß mit einem β -Galactosidase-Assay auf Reporteraktivität geprüft werden kann (Shaywitz et al. 2002). Dabei ist die Reporteraktivität um so höher, je stärker die Interaktionspartner miteinander interagieren (Shaywitz et al. 2002; Dove et al. 1997). Für den β -Galactosidase-Assay (Miller 1972) wurde LB-Medium, das Chloramphenicol, Tetracyclin und Kanamycin

enthielt (LB-CTK), mit Glycerol-stocks der BMI-Zellen, die die zu untersuchenden Interaktionspartner als pBT- und pTRG-Plasmide trugen, angeimpft und für ca. 24 bis 30 Stunden bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Dann wurden von jedem Ansatz jeweils 30 µl in frisches LB-CTK Medium, das entsprechende Mengen IPTG enthielt, überimpft und für ca. 18 Stunden bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Das IPTG induzierte die Expression der Bait- und Target-Proteine. Anschließend wurde die OD(600) als Maß für die Bakteriendichte gemessen und jeder Ansatz so in frisches LB-CTK Medium, das IPTG enthielt, verdünnt, daß daraus eine theoretische OD(600) von ca. 0,15 resultierte. Die Bakterien wurden für weitere 1 bis 2 Stunden bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die OD(600) wurde erneut gemessen und zur Berechnung der Miller Units (siehe unten) notiert. Die OD(600) sollte dabei zwischen 0,2 und 0,6 liegen. Die Bakterienzellen wurden anschließend für mindestens 20 Minuten auf Eis gestellt. Währenddessen wurde für jeden Ansatz jeweils ein Reagenzglas vorbereitet, in das 800 µl Puffer Z (siehe 2.1.2) vorgelegt wurden. Von jedem Ansatz wurden dann 200 µl der Bakteriensuspension in das Reagenzglas gegeben und außerdem je 30 µl 0,1 % SDS sowie 60 µl Chloroform. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit 200 µl Medium statt Bakteriensuspension in gleicher Weise angefertigt. Jedes Reagenzglas wurde dann für 6 Sekunden gevortext. Die Proben sowie die ONPG-Lösung (siehe 2.1.2) wurden zum Äquilibrieren für 10 Minuten in ein 28 °C Wasserbad gestellt. Dann wurden zu jedem Ansatz 200 µl der ONPG-Lösung zugegeben und kurz gemischt. ONPG ist ein farbloses Substrat, das durch β-Galactosidase umgesetzt werden kann und dann eine gelbe Färbung entwickelt. Die Ansätze wurden anschließend im 28 °C Wasserbad inkubiert, bis die Gelbfärbung eintrat. Die Aktivität der β-Galactosidase konnte dann durch Zugabe von 500 µl einer 1 M Natriumcarbonat-Lösung gestoppt werden, da das Enzym im Alkalischen nicht arbeitet. Dabei wurde darauf geachtet, daß alle Proben ungefähr ähnliche Intensitäten der Gelbfärbung entwickelten (als Anhaltspunkt diente dabei die Gelbfärbung von LB-Medium). Die Zeit, die vom Starten der Reaktion durch Zugabe der ONPG-Lösung bis zum Stoppen der Reaktion mit der Natriumcarbonat-Lösung vergangen war, wurde für jeden Ansatz notiert. Sie bewegte sich im Rahmen von ca. 20 Minuten bis 3 Stunden. Anschließend wurden die Absorptionen der Proben photometrisch bei 420 nm für die Gelbfärbung und 550 nm für die Korrektur der Lichtstreuung gemessen. Dabei sollten die OD(420)-Werte idealerweise zwischen 0,6 und 0,9 liegen. Die Negativkontrolle mit Medium statt Bakteriensuspension diente bei den photometrischen Messungen als Referenz. Anschließend konnten die Miller Units als Maß für die β-Galactosidase-Aktivität nach folgender Formel berechnet werden (Miller 1972):

$$MillerUnits = \frac{1000 \cdot (OD420 - 1,75 \cdot OD550)}{T \cdot V \cdot OD600},$$

wobei T die Reaktionszeit bis zur Entwicklung der Gelbfärbung in Minuten und V das Volumen der eingesetzten Bakteriensuspension in ml (in diesem Fall 0,2) ist.

2.2.6 Co-Immunopräzipitation

Um die Interaktion zwischen zwei Proteinen biochemisch nachzuweisen, wurde die Co-Immunopräzipitation, siehe auch Abbildung 29, verwendet. Dazu wurden HeLa-Zellen zu ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen in 10 cm Zellkulturschälchen ausgesät (siehe 2.2.3.1) und mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für die auf Interaktion zu untersuchenden Proteine codieren (siehe 2.2.3.2). Dabei wurden unter anderem Plasmide eingesetzt, die für Fusionsproteine mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) codieren (siehe 3.2.2.2). Daher konnte die Expression dieser Proteine mikroskopisch verfolgt werden und die Zellernte zum Zeitpunkt ausreichender Expression stattfinden. Dies war 1 bis 2 Tage nach Transfektion möglich. Zur Ernte wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 500 μ l Puffer für die Co-Immunopräzipitation mit Protease-Inhibitoren (siehe 2.1.2) zugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 4 °C geschwenkt. Danach wurde die Zellsuspension in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und die Zellkerne aufgeschlossen, indem die Zellsuspension wiederholt durch eine 23G Nadel gezogen wurde. Als Probe „L“ (siehe 3.2.2.2) wurde jeweils ein 70 μ l Aliquot der aufgeschlossenen Zellsuspension entnommen und mit 4xLDS Probenpuffer versetzt. Diese Probe stellte das Ausgangsmaterial der Co-Immunopräzipitation dar und enthielt alle in den HeLa-Zellen exprimierten Proteine. Der Rest der aufgeschlossenen Zellsuspension wurde mit je 2 μ l eines rabbit anti-GFP Antikörpers (Invitrogen) der Konzentration 2 μ g/ μ l versetzt und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurden je 110 μ l ProteinG Sepharose (Pierce) zugegeben und die Ansätze für 3 Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert. Dann wurden die Ansätze für 2 Minuten bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert und damit die ProteinG Sepharose mit den daran gebundenen Antikörpern und den an die Antikörper gebundenen GFP-Fusionsproteine mitsamt deren Interaktionspartnern pelletiert. Das Pellet wurde insgesamt 4 mal mit je 500 μ l Co-Immunopräzipitations-Puffer ohne Protease-Inhibitoren gewaschen, wobei der Überstand jeweils vorsichtig mit einer Spritze abgenommen wurde, das Pellet in frischem Puffer für jeweils ca. 10 Sekunden gevortext wurde und dann erneut für 2 Minuten bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert wurde. Die letzte Wasch-Fraktion wurde als Probe „W“ aufbewahrt und mit 4xLDS Probenpuffer versetzt. Sie diente als Kontrolle dafür, daß aus der Fraktion „L“ keine Proteine unspezifisch mit in die Fraktion „IP“ der Immunopräzipitation verschleppt wurden. Nach den Wasch-Schritten wurde das Pellet der Immunopräzipitation als Fraktion „IP“ mit 40 μ l 4xLDS Probenpuffer versetzt. Anschließend wurde ein Westernblot (siehe 2.2.2.1, 2.2.2.2) jeweils der Fraktionen L, W und IP durchgeführt und mittels der entsprechenden Antikörper auf Präsenz der auf Interaktion zu testenden Proteine untersucht.

2.2.7 Zytotoxizitäts-Test

Die in dieser Arbeit identifizierten neuen Rev-Interaktoren wurden mit Hilfe des CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay von Promega auf ihre zytotoxische

Wirkung auf humane Zellen hin untersucht. Bei diesem Assay wird die Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus Zellen mit beschädigter Zellmembran gemessen (LDH release Assay) (Korzeniewski und Callewaert 1983; Decker und Lohmann-Matthes 1988). Die Freisetzung der LDH in das Zellkulturmedium wird durch Zugabe des Substrates Resazurin gemessen, das durch LDH enzymatisch zu dem fluoreszierenden Resorufin umgesetzt wird. Die relative Menge an Resorufin kann im Fluorometer bestimmt werden. Die Umsetzung des Substrates in das fluoreszierende Produkt ist proportional zur Menge an freigesetzter LDH. Daher ist die relative Fluoreszenz proportional zur Toxizität des zu testenden Faktors. Das in diesem Test eingesetzte Substrat (Resazurin) schädigt keine gesunden Zellen.

Der CytoTox-ONE Zytotoxizitäts-Test wurde im 96-Loch-Platten Format durchgeführt. Dazu wurden HeLa Zellen zu je $5 \cdot 10^3$ Zellen pro Loch in 100 μ l Zellkulturmedium ausgesät und am folgenden Tag mit Plasmiden, die für die Expression der auf Toxizität zu testenden Faktoren codierten, transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde FuGENE (siehe 2.2.3.2) verwendet. Da nicht auszuschließen ist, daß FuGENE selbst die Integrität der Zellmembran beeinflusst, wurden einige Zellen der 96-Loch-Platte nur mit FuGENE ohne DNA versetzt und der Mittelwert dieser Kontrolle für die durch das Transfektionsreagenz FuGENE alleine verursachte Toxizität ermittelt. Die Plasmide, die für die Expression der auf Toxizität zu testenden Faktoren codierten, wurden in unterschiedlichen Mengen von 10 ng bis 100 ng transfiziert. Nachdem die gewünschte Zeitspanne nach der Transfektion verstrichen war, wurde der eigentliche Zytotoxizitäts-Test durchgeführt. Dazu wurde die 96-Loch-Platte aus dem 37 °C Inkubator genommen und für ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert. Dann wurden zur Generierung der Positivkontrolle für die Toxizität einige Löcher mit je 2 μ l der mitgelieferten Lyse-Lösung versetzt. Anhand des Mittelwerts der Fluoreszenz dieser Positivkontrollen wurde 100 % Toxizität definiert und alle übrigen Ansätze relativ darauf bezogen. Zu jedem Loch wurde CytoTox-ONE Reagenz mit gleichem Volumen wie das in diesem Loch befindliche Zellkulturmedium zugegeben und die Platte kurz geschüttelt. Die Platte wurde anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die mit dem Kit mitgelieferte Stop-Lösung mit einem Volumen von je der Hälfte des Volumens des CytoTox-ONE Reagenz jedem Loch zugegeben. Die Platte wurde kurz geschüttelt und dann die Fluoreszenz im Fluorometer bei 544 nm Anregungswellenlänge und 590 nm Emissionswellenlänge gemessen.

2.2.8 BLAST-Techniken zur Datenbankanalyse von DNA- und Proteinsequenzen

Anhand einer humanen fötalen cDNA-Bibliothek aus Gehirn wurden neue Rev interagierende Proteine identifiziert (siehe Ergebnisse 3.1). Die dazu gehörigen Plasmide pTRG-B1-1 und pTRG-B2-92 wurden zur Sequenzierung gegeben. Anhand der Sequenz wurde dann Datenbankrecherche mit dem NCBI BLAST Programm (Tatusova und Madden 1999) (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) betrieben. Zunächst wurde die zur

jeweiligen cDNA gehörende humane mRNA Sequenz ermittelt. Dazu wurden mit dem Programm „BLASTn“ die Nukleotid-Datenbanken durchsucht. Weil mit eindeutigen Suchergebnissen zu rechnen war, wurde die Suche auf die nr Datenbank beschränkt. (Diese umfaßt Sequenzen von GenBank, EMBL, DDBJ und PDB Sequenzen, aber keine EST, STS, GSS, oder Phase 0, 1 oder 2 HTGS Sequenzen.) Da es sich dabei um lange Sequenzen handelte, wurde die Matrix BLOSUM62 (Henikoff und Henikoff 1992) verwendet. So konnte eindeutig festgestellt werden, daß die Sequenzen der cDNAs B1-1 und B2-92 von den humanen mRNAs abstammen, die für die Proteine GST A4 bzw. VPS 28 codieren. Im Anhang (siehe 5.4) sind die BLAST Ergebnisse für B1-1 und B2-92 dargestellt und die dazu gehörigen Sequenzen der mRNAs und der davon exprimierten Proteine angegeben.

In einem zweiten Schritt wurde anhand der Sequenzen der Plasmide pTRG-B1-1 bzw. pTRG-B2-92 ermittelt, welche Proteinsequenz von diesen Plasmiden als Fusion mit der RNA Polymerase α Untereinheit exprimiert wird. Mit diesen B1-1- bzw. B2-92-Proteinsequenzen wurde die nr Proteindatenbank mit dem Programm „BLASTp“ durchsucht. Dabei stellte sich heraus, daß es nur Treffer gab, die den Proteinsequenzen entsprachen, die von den vorher identifizierten mRNA-Sequenzen exprimiert werden. Dies zeigt, daß die entsprechenden Proteine auch in den pTRG-Plasmiden im richtigen Leseraster exprimiert werden. So konnte auch leicht ermittelt werden, welche Aminosäuresequenz aus GST A4 in B1-1 bzw. aus VPS 28 in B2-92 exprimiert wird (da aus cDNAs exprimierte Proteine häufig aminoterminal trunziert sind, siehe Abbildung 33, 4.3.1).

Bei den Sequenzanalysen wurde außerdem beachtet, daß die bakteriellen Zellen, die pTRG-B1-1 und pTRG-B2-92 exprimieren, eine Amber Supressor Mutation aufweisen (siehe 2.1.9.1), so daß TAG Stop-Codons teilweise überlesen werden. Das Amber-Stop-Codon kommt jedoch weder bei B1-1 noch bei B2-92 vor.

2.3 Das bakterielle Zwei-Hybrid-System

Das bakterielle Zwei-Hybrid-System BacterioMatch von Stratagene basiert auf der Methodik von Dove et al. (1997) und Dove und Hochschild (1998). Das BacterioMatch Zwei-Hybrid-System funktioniert durch transkriptionelle Aktivierung: ein Protein von Interesse („Bait“ – in der vorliegenden Arbeit Rev) ist an den *cl* Repressor des Bacteriophagen λ fusioniert, so daß es damit die aminoterminal DNA-Bindedomäne von *cl* erhält. Das korrespondierende auf Interaktion zu überprüfende Protein („Target“) ist an die aminoterminal Domäne der α -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase fusioniert. Das Bait-Protein bindet über die λ *cl* Fusion an die λ Operator Sequenz, die sich vor dem Reporter-Promotor befindet. Falls Bait- und Target-Proteine miteinander interagieren, rekrutiert die aminoterminal Domäne der RNAP α -Untereinheit des Target-Proteins die bakterielle RNA-Polymerase an den Reporter-Promotor, stabilisiert das RNA-Polymerase-Holoenzym und aktiviert die Transkription des Reporters.

Abbildung 9 zeigt die Komponenten des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems Bacterio-Match in der Übersicht.

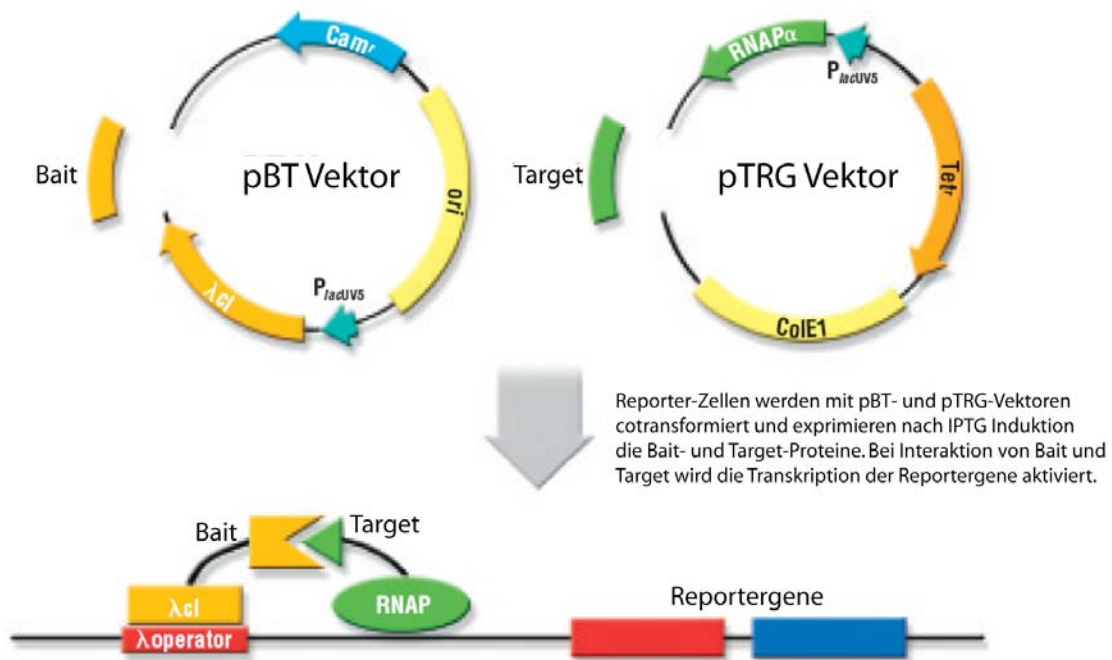


Abbildung 9: Übersicht über das bakterielle Zwei-Hybrid-System BacterioMatch von Stratagene.
(Nach Stratagene, verändert)

Das Bait-Plasmid pBT: codiert für den λ cI Repressor des Bacteriophagen λ unter der Kontrolle des starken lacUV5-Promotors. Die Transkription von diesem Promotor ist induzierbar durch IPTG. Das Protein von Interesse (Bait) wird an den λ cI Repressor fusioniert, indem die DNA-Sequenz an das 3' Ende des λ cI Gens einkloniert wird. Die pBT-Plasmide codieren außerdem für Chloramphenicol-Resistenz.

Das Target-Plasmid pTRG: codiert für aminoterminaler Domäne der α -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines Tandem-Promotors aus lpp und lacUV5. Die Transkription von diesem Promotor ist ebenfalls induzierbar durch IPTG. Das Target-Protein wird an die RNAP α -Untereinheit anfusioniert, indem die DNA-Sequenz an das 3' Ende des RNAP α Gens einkloniert wird. Die in dieser Arbeit verwendete humane fötale cDNA-Bibliothek aus Gehirn wurde unidirektional in pTRG kloniert von Stratagene bezogen. Die pTRG-Plasmide codieren für Tetracyclin-Resistenz.

Beide Plasmide pBT und pTRG sind low-copy Plasmide. Die Transkription von Bait und Target ist jeweils durch IPTG induzierbar. In den Bakterien liegen die pBT-Plasmide mit ca. 10 Kopien pro Zelle vor (low-copy p15A ori), die pTRG-Plasmide mit ca. 20 bis 30 Kopien pro Zelle (low-copy ColE1 ori).

Bakterielle Reporter-Zellen: Es gibt zwei Typen von Reporter-Zellen, BMI und BMII Zellen (siehe unten), die sich lediglich durch die Reporter-Gene unterscheiden. Die Reporter-Stämme sind Derivate von XL1-Blue MRF' Zellen. Der lac Repressor Lac I^q wird auf einem F' Episom codiert und reprimiert die Synthese der Bait- und Target-Proteine bis zur Induktion mit IPTG. Allerdings ist diese Reprimierung unvollständig, da Bait und Target auf niedrigem Niveau basal exprimiert werden. Daher gibt es im BacterioMatch-System stets eine niedrige Basalexpression der Reportergene. Die Reporter-Kassetten befinden sich jeweils auch auf dem F' Episom.

2.3.1 Das BMI-System

Reportergene im BacterioMatch I System sind die Gene für β -Lactamase (*bla* bzw. *amp^r*) und β -Galactosidase (*lacZ*). Die β -Lactamase verleiht Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika wie Ampicillin oder Carbenicillin. Ursprünglich war dieses Reporter gen von Stratagene als Selektionsmarker für das Screening einer cDNA-Bibliothek vorgesehen. Es stellte sich jedoch heraus, daß es keine sehr stringente Selektion erlaubt und das Wachstum vieler falsch positiver Kolonien ermöglicht (Stratagene und eigene Erfahrungen). Aus diesem Grund wurde das BacterioMatch II System entwickelt, bei dem die Reportergene durch Gene ausgetauscht wurden, die erheblich stringenteres Screening erlauben und den Anteil falsch Positiver deutlich senken, s.u..

Als zweites Reporter gen wird vom selben Reporter-Promotor polycistronisch das Gen für die β -Galactosidase *lacZ* exprimiert. Dieses Reporter gen eignet sich dazu, die Interaktionsstärke zwischen Bait und Target im β -Galactosidase-Assay (siehe 2.2.5) abzuschätzen, denn die Reporteraktivität ist proportional zur Interaktionsstärke zwischen Bait und Target (Shaywitz et al. 2002; Dove et al. 1997).

Abbildung 10 zeigt die Organisation der Reportergene im BacterioMatch I System.



Abbildung 10: Reportergene des BacterioMatch I Systems. (Nach Stratagene, verändert)

2.3.2 Das BMII-System

Reportergene im BacterioMatch II System sind einerseits das Gen *HIS3* aus Hefe und andererseits das *aadA* Gen. Das *aadA* Gen verleiht Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Streptomycin. Das *HIS3* Gen ermöglicht es den BM II Reporterzellen (siehe 2.1.9.1), die auxotroph für die Aminosäure Histidin sind, auf Histidin-Mangelmedium zu wachsen. Das *HIS3* Gen komplementiert dabei eine *hisB* Mutation in den Bakterienzellen. Die niedrige Basalexpression der Reportergene ermöglicht es den BM II Zellen, auf dem Histidin Mangelmedium M9 His DO zu wachsen. Wenn eine Interaktion zwischen Bait und Target stattfindet, ermöglicht die stark gesteigerte Transkription des *HIS3* Gens Wachstum auf Histidin Mangelmedium, das zusätzlich 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) enthält, welches als kompetitiver Inhibitor auf das *HIS3* Genprodukt wirkt.

Die BacterioMatch II Reporterzellen erlauben durch den Austausch der Reportergene ein im Vergleich zu BacterioMatch I Reporterzellen erheblich stringenteres Screening von cDNA-Bibliotheken und senken nach Angaben von Stratagene das Auftreten von falsch Positiven um mehr als das 100fache.

Abbildung 11 zeigt die Organisation der Reportergene im BacterioMatch II System.



Abbildung 11: Reportergene des BacterioMatch II Systems. (Nach Stratagene, verändert)

2.3.3 Die humane fötale cDNA-Bibliothek aus Gehirn

Abbildung 12 zeigt schematisch die Konstruktion der von Stratagene hergestellten cDNA-Bibliothek aus humanem fötalem Gehirn.

Die RNA wurde aus dem Gewebe isoliert. Der erste Strang der cDNA wurde durch eine Moloney murine leukemia virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT), deren RNaseH-Aktivität durch Mutation zerstört wurde, synthetisiert. Dazu wurde ein Oligo-dT-Primer verwendet, der die Poly(A)-Region der mRNA bindet. Dieser Primer trägt außerdem die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XhoI. Die bei der Synthese des ersten Stranges eingesetzte Nucleotid-Mischung enthielt 5-Methyl-dCTP. Auf diese Weise erhielt der erste Strang eine Methyl-Gruppe an jedem Cytosin und konnte somit nicht von Restriktionsenzymen geschnitten werden, die in nachfolgenden Schritten eingesetzt wurden (siehe unten). Danach wurde RNase H zugegeben, die in die an den ersten cDNA-Strang gebundene RNA Einzelstrangbrüche einfügte. Auf diese Weise wurde bei

der Synthese des zweiten Stranges durch DNA Polymerase I die RNA abgebaut und DNA eingefügt („nick translation“). So wurde die doppelsträngige cDNA gebildet. Anschließend wurden überhängende Enden durch Pfu DNA Polymerase aufgefüllt bzw. gestutzt, so daß stumpfe Enden („blunt ends“) entstanden. An diese wurden dann EcoRI-Adapter ligiert. Durch Verdau mit dem Restriktionsenzym XhoI entstand das fertige cDNA-Produkt, das vorgeschchnittene Enden für die Restriktionsenzyme EcoRI (am 5' Ende) und XhoI (am 3' Ende) aufwies. Somit konnte dieses cDNA-Produkt in den Vektor pTRG, der mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI vorgeschritten wurde, ligiert werden. Eine auf diese Weise hergestellte cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn im pTRG-Vektor wurde von Stratagene bezogen und zur Identifizierung neuer HIV Rev interagierender Proteine benutzt. Die verwendete cDNA-Bibliothek bestand aus einem Pool von 10 männlichen und weiblichen fötalen Gehirnen im Alter von 21 bis 30 Wochen mit einer primären Größe von $3,4 \cdot 10^6$ cfu und einer durchschnittlichen Insert-Größe von 1,5 kb.

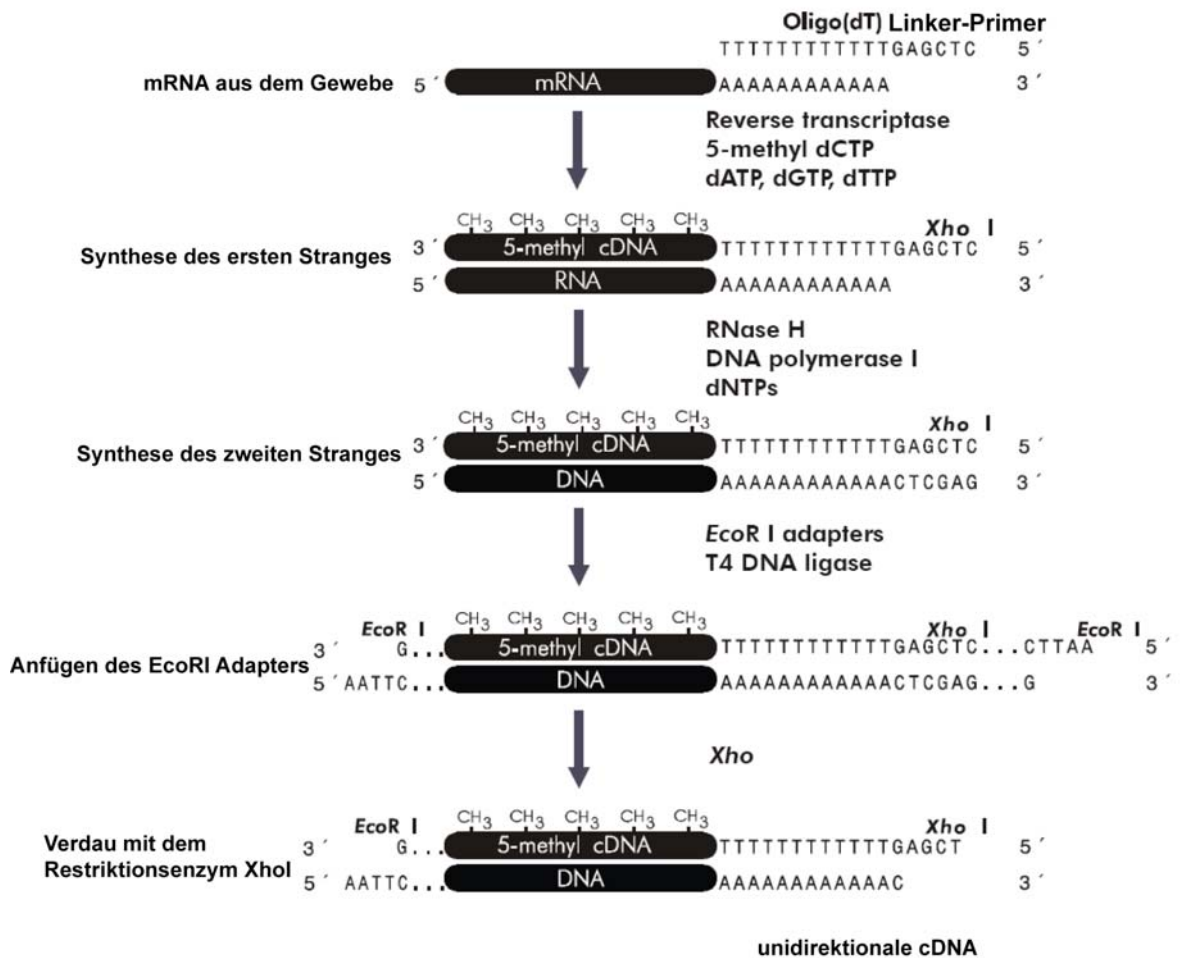


Abbildung 12: Schematischer Ablauf der Konstruktion der cDNA-Bibliothek von Stratagene. (Nach Stratagene, verändert)

2.3.4 Ernte der cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn.

Die cDNA-Bibliothek lag kloniert in pTRG-Plasmide in XL1-Blue MRF' Kan Zellen vor. Aus diesen Bakterienzellen mußten zunächst die pTRG-cDNA Plasmide isoliert werden, damit die so präparierte Bibliothek zusammen mit pBT-Rev in die BacterioMatch Reporterzellen cotransformiert und auf Interaktion getestet werden konnte. Zunächst wurden Aliquots der XL1-Blue MRF' Kan Zellen entnommen und in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Tetracyclin Agarplatten ausplattiert, um die Anzahl der wachsenden Kolonien zu bestimmen. Daraus ergab sich ein Titer von $9,46 \cdot 10^8$ cfu/ml. Anhand dieses Wertes konnte berechnet werden, welches Volumen der Bakteriensuspension für die Ernte der pTRG-cDNA Plasmide pro Agarplatte einzusetzen war und wie viele Agarplatten insgesamt notwendig waren. So wurde die Bibliothek auf insgesamt 39 LB-Tetracyclin Agarplatten mit je 150 mm Durchmesser ausplattiert und dabei ein Wert von ca. 45000 cfu/Platte angestrebt, damit individuelles Wachstum jeder einzelnen Kolonie möglich war. Insgesamt wurde damit auf allen Agarplatten zusammen ca. $1,8 \cdot 10^6$ cfu ausplattiert. Nach 28 Stunden Wachstum bei 30 °C, was auch das Aufkommen von Bakterienkolonien, die toxische cDNAs enthielten, ermöglichte, wurde die Bibliothek wie folgt geerntet. Pro Agarplatte wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben, die Bakterien mit einem cell scraper von der Platte abgekratzt und in ein auf Eis gekühltes 50 ml BD Falcon Gefäß gegeben. In diesem Gefäß wurden die Bakterien aller Agarplatten gesammelt. Dann wurde so viel eiskaltes SOC-Medium zugegeben, daß sich die Bakteriensuspension gut pipettieren ließ und das Volumen der gesamten Bakteriensuspension notiert. Anschließend wurden Aliquots der Bakteriensuspension entnommen und in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Tetracyclin Agarplatten ausplattiert, um den neuen Titer zu bestimmen. Dieser betrug $2,70 \cdot 10^7$ cfu/ml. Die Hälfte der Bakteriensuspension wurde einer Plasmid DNA Maxipräparation unterzogen (siehe 2.2.1.1.2), um die pTRG-cDNA Plasmide zu isolieren, die andere Hälfte der Bakteriensuspension wurde als Glycerol-Vorräte eingefroren (siehe 2.2.1.7). Die auf diese Weise isolierte cDNA-Bibliothek in pTRG-Plasmiden wurde dann für das Screening auf HIV-Rev Interaktoren eingesetzt (siehe Ergebnisse 3.1).

2.4 Computerprogramme

Soweit nicht anders angegeben, laufen alle Softwareprogramme auf Apple Macintosh Computern mit Mac OS X Betriebssystem.

Adobe Illustrator 12.0.0	Adobe Systems, USA
Adobe PhotoShop 9.0	Adobe Systems, USA
Ascent Software für Fluoroskan	Thermo Labsystems, Helsinki, Finnland
Ascent Plattenleser (Windows XP)	
Axiovision 4.0 (Windows XP)	Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos

EndNote 9.0.0	Niles Software, USA
Gene Construction Kit 2.5	Textco Corp., USA
iMol 0.31	http://www.pirx.com/iMol/
MacVector 7.0	Accelrys, SanDiego, USA
Microsoft Excel 2004	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Word 2004	Microsoft Corporation, USA
Quantity One 4.2.1 (Windows XP)	Biorad, München
Sequencher 4.6	Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA

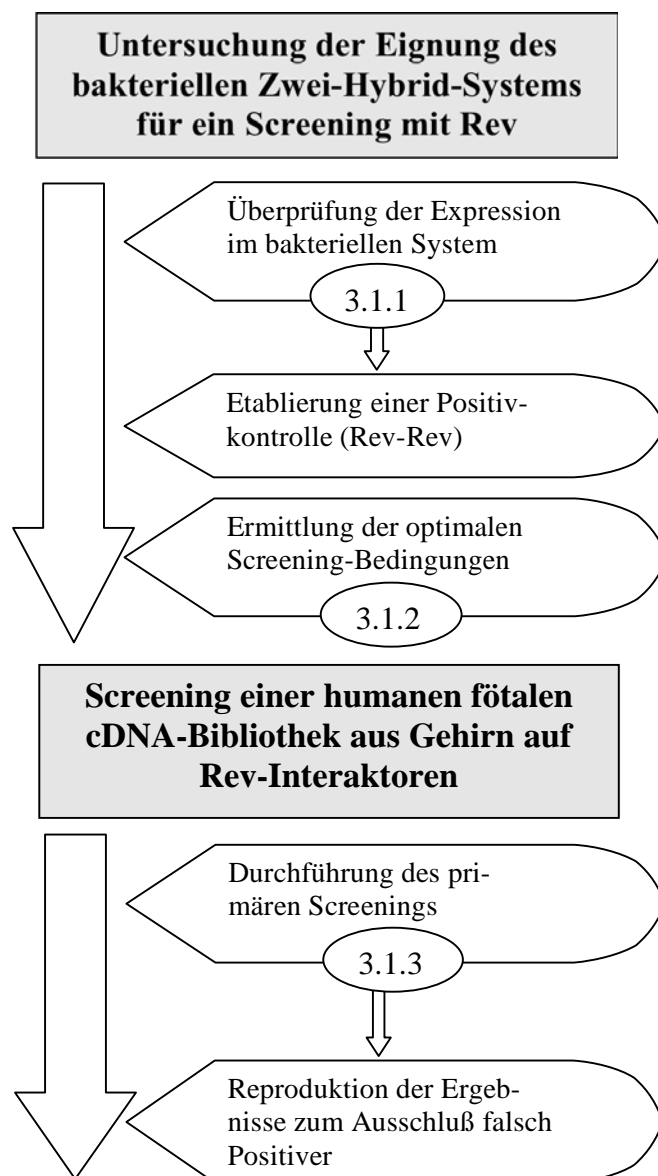
2.5 DNA-Sequenzierungen

Bei Klonierungen, die PCR beinhalteten, wurde eine Sequenzierung der PCR-Produkte zum Ausschluß von PCR-Fehlern veranlaßt. Dazu wurde mindestens 1 µg des entsprechenden Plasmids in säulenchromatographisch aufgereinigter Form (siehe 2.2.1.1) dem Sequenzier-Service Sequiserve, Bahnhofstr. 30, 85591 Vaterstetten geschickt. Der Vergleich zwischen Referenz-Sequenz (konstruiert mit dem Computerprogramm Gene Construction Kit 2.5) und der erhaltenen Sequenzierung wurde mit dem Computerprogramm Sequencher 4.6 durchgeführt. Nur Plasmide mit fehlerfreien Sequenzen wurden für weitere Klonierungen bzw. Experimente verwendet.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, neue zelluläre Rev-interagierende Proteine zu finden. Dabei sollen mit Hilfe eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems aus einer cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn möglichst solche neuen Proteine identifiziert werden, die Rev sowohl direkt als auch mit besonders hoher Affinität binden können (siehe Zielsetzung 1.4).

Die Schritte zur Erreichung dieses Ziels und die jeweils verfolgte Vorgehensweise sind schematisch in Abbildung 13 zu sehen.



Fortsetzung nächste Seite

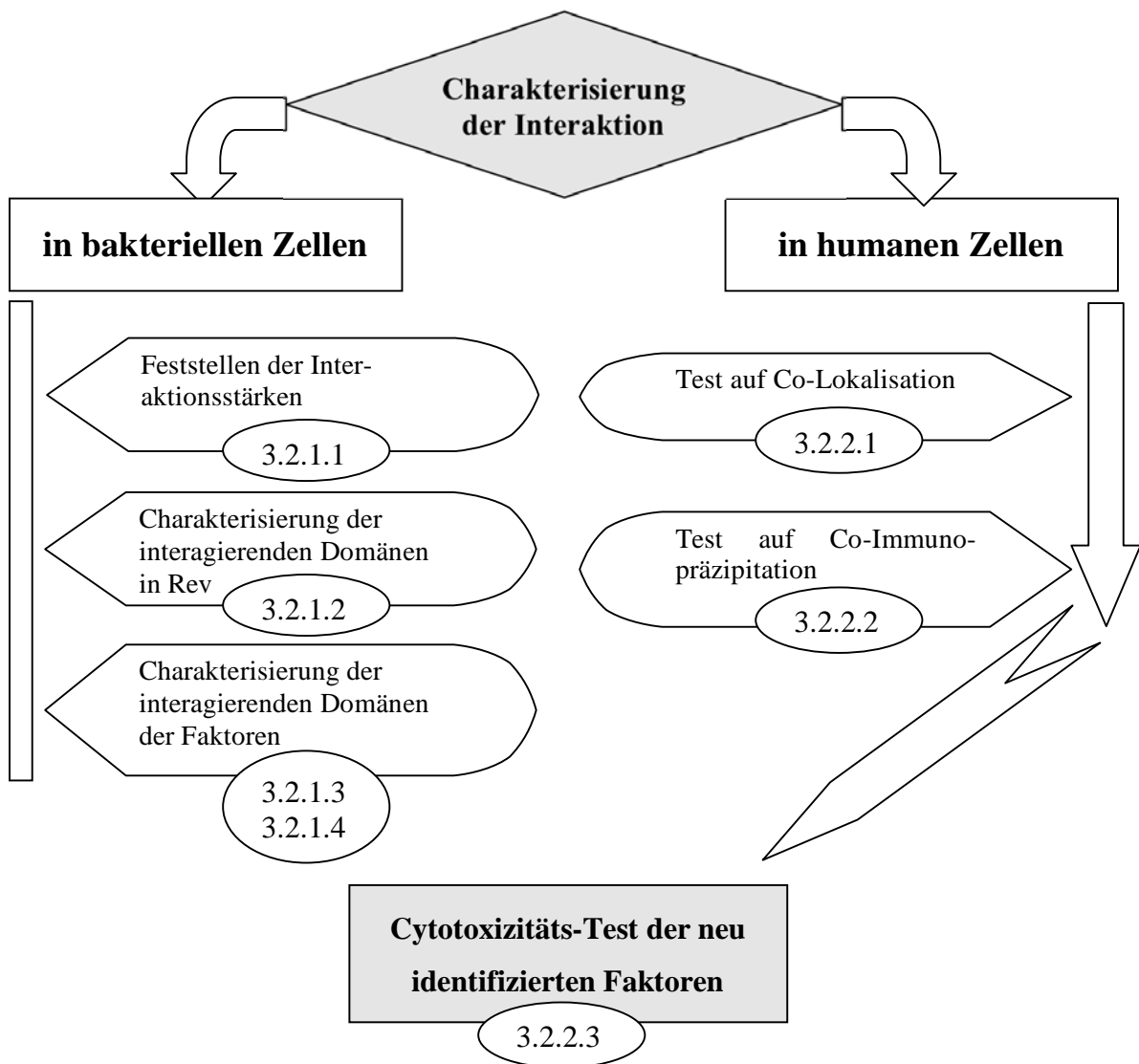


Abbildung 13: Schematischer Ablauf der Identifizierung und Charakterisierung neuer Rev-interagierender Proteine.

Im folgenden werden die Ergebnisse zu den in Abbildung 13 dargestellten Schritten detailliert dargestellt. Am Ende jedes Kapitels werden die wichtigsten Ergebnisse kurz zusammengefasst.

3.1 Identifizierung neuer Rev-interagierender Faktoren mit Hilfe eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems

Die Identifizierung neuer Rev-interagierender Faktoren wurde durch cDNA-Screening mit Hilfe eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems (BacterioMatch, Stratagene) durchgeführt, siehe 2.3. Dazu wurde zunächst ermittelt, ob dieses System für ein Screening mit Rev geeignet ist. Insbesondere müssen zunächst die Fragen geklärt werden, ob Rev im Kontext des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems in der zu erwartenden Größe exprimiert wird und ob Rev in der Lage ist, den Reporter spezifisch zu aktivieren. So darf der Reporter nur aktiviert werden, wenn Rev einen Interaktionspartner vorfindet – nicht jedoch ohne Interaktionspartner.

3.1.1 Etablierung der Rev-Rev-Positivkontrolle für das bakterielle Zwei-Hybrid-System

Als Positivkontrolle für das bakterielle Zwei-Hybrid-System wurde die Interaktion von Rev mit sich selbst (Rev-Oligomerisierung) verwendet. Dazu wurde Rev jeweils in die Vektoren pBT und pTRG kloniert, so daß pBT-Rev und pTRG-Rev resultierten. Zunächst wurde untersucht, ob Rev in Bakterien als Fusionsprotein mit der zu erwartenden Größe exprimiert wird, siehe Abbildung 14. Dazu wurden BMI-Zellen mit verschiedenen Kombinationen an Bait- und Target-Plasmiden co-transformiert, die Expression mit IPTG induziert und die Bakterienzellen nach 4 Stunden geerntet. Die OD(600) als Maß für die Bakteriendichte wurde bei allen Ansätzen gemessen und dementsprechend in alle Spuren ungefähr gleich viele Bakterien aufgetragen. Im Westernblot mit anti-Rev-Antikörpern zeigten sich die für pBT-Rev (λ cl-Rev-Fusion) bei 40,4 kD zu erwartende Bande als auch die für pTRG-Rev (RNAP α -Rev-Fusion) bei 42,0 kD zu erwartende Bande (Abbildung 14, Spuren 1 bzw. 2). BMI-Zellen, die mit pBT-Rev und pTRG-Rev gleichzeitig transformiert wurden, wiesen beide Banden auf (Abbildung 14, Spur 3). Rev wird also in den für das bakterielle Zwei-Hybrid-Screening benutzten Zellen als Bait- sowie auch als Target-Fusionsprotein exprimiert.

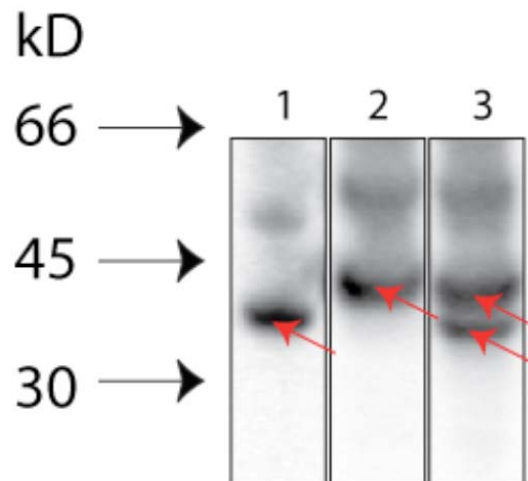


Abbildung 14: Expression von λ cl-Rev (von pBT-Rev) und RNAP α -Rev (von pTRG-Rev) im bakteriellen System. BMI-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transformiert, die Expression wurde jeweils mit 20 μ M IPTG induziert; die Bakterienzellen wurden nach 4 Stunden für den Westernblot geerntet. Die Detektion im Westernblot erfolgte mit anti-Rev-Antikörpern (5C6). **Spur 1:** pBT-Rev und pTRG; **Spur 2:** pBT und pTRG-Rev; **Spur 3:** pBT-Rev und pTRG-Rev. Die zu erwartenden Größen sind 40,4 kD für λ cl-Rev (Pfeil in Spur 1) und 42,0 kD für RNAP α -Rev (Pfeil in Spur 2). In Spur 3 ist die gleichzeitige Expression beider Fusionsproteine zu sehen.

Anschließend wurde untersucht, ob sich erstens die Rev-Rev-Interaktion im bakteriellen Zwei-Hybrid-System nachweisen lässt, und ob zweitens Rev auch ohne Interaktionspartner den Reporter aktiviert. Das bakterielle Zwei-Hybrid-System ist nur dann für ein cDNA-Screening geeignet, wenn sich der Reporter nur mit einem Interaktionspartner aktivieren lässt.

Für diese Untersuchungen wurden BMI-Zellen mit pBT-Rev und pTRG-Rev sowie mit Negativkontrollen co-transformiert. Die Negativkontrollen waren im Einzelnen:

- pBT / pTRG: die Kombination aus leerem Bait- und leerem Target-Plasmid gibt die Basalexpression des Reporters an;
- pBT-Rev / pTRG: die Kombination aus Bait-Rev (λ cl-Rev-Fusion) und leerem Target-Plasmid zeigt, ob Rev alleine ohne Interaktionspartner den Reporter aktivieren kann und zeigt damit an, ob das bakterielle Zwei-Hybrid-System für ein cDNA-Screening mit Rev geeignet ist;
- pBT / pTRG-Rev: die Kombination aus leerem Bait-Plasmid und Target-Rev (RNAP α -Rev-Fusion) zeigt, ob der Reporter ohne die DNA-bindende Domäne des Bait-Plasmids alleine durch Target-Rev aktivierbar ist, und stellt somit die Kontrolle für die Spezifität der Rev-Rev-Interaktion dar.

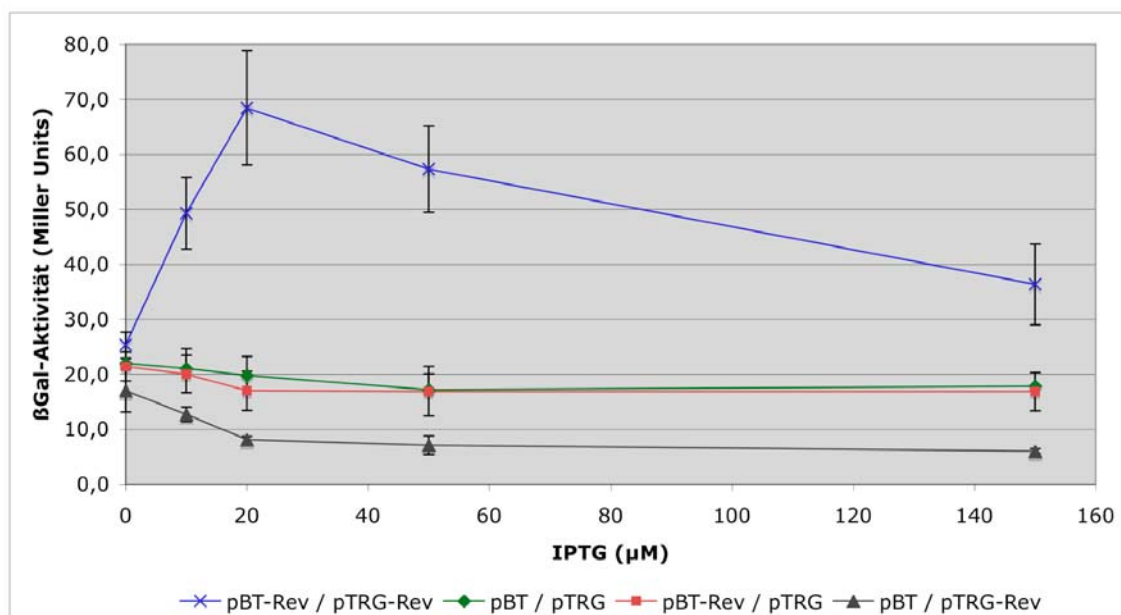


Abbildung 15: β -Galactosidase-Reporteraktivität (ausgedrückt in Miller Units) für die Rev-Rev-Positivkontrolle und Negativkontrollen. BMI-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transformiert und auf β -Galactosidase-Reporteraktivität untersucht. Die Positivkontrolle wird dargestellt durch die Datenpunkte X: pBT-Rev / pTRG-Rev und die Negativkontrollen durch ◆: pBT / pTRG; ■: pBT-Rev / pTRG sowie ▲: pBT / pTRG-Rev. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte aus 2-5 unabhängigen Experimenten und sind mit Standardabweichung dargestellt (pBT-Rev/pTRG-Rev n=5; pBT/pTRG n=2; pBT-Rev/pTRG n=3; pBT/pTRG-Rev n=2).

Die Expression der Bait- und Target-Plasmide wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an IPTG induziert und die Reporteraktivität mittels β -Galactosidase-Assay bestimmt, siehe Abbildung 15. Dabei zeigte sich, daß die Reporteraktivität der Rev-Rev-Interaktion deutlich größer ist als die aller Negativkontrollen. Die höchste Reporteraktivität war bei 20 μ M IPTG zu sehen. Danach nahm die Reporteraktivität offensichtlich aufgrund toxischer Effekte wieder ab. Die pBT / pTRG Negativkontrolle schwankte um einen Wert von ca. 20 Miller Units, der offensichtlich die Basalaktivität des Reporters wiedergibt. Die pBT-Rev / pTRG Kontrolle lag immer sehr nahe der Basalaktivität und zeigte damit zum einen, daß es kaum toxische Effekte durch pBT-Rev gibt und zum anderen, daß Bait-Rev ohne Interaktionspartner den Reporter nicht aktivieren kann. Dies ist eine essentielle Voraussetzung für das Screening einer cDNA-Bibliothek mit dem bakteriellen Zwei-Hybrid-System. Die pBT / pTRG-Rev Kontrolle lag offensichtlich aufgrund toxischer Effekte von Rev im Target-Kontext unter der Reporter-Basalaktivität (pBT / pTRG). Trotzdem zeigte Target-Rev zusammen mit Bait-Rev eine deutliche Reporteraktivität, was darauf hindeutet, daß im Screening einer cDNA-Bibliothek wahrscheinlich auch Target-cDNAs, die für sich genommen toxisch in Bakterien sind, den Reporter mit Bait-Rev deutlich aktivieren können.

Die Westernblots zur Expression von Bait- und Target-Rev (Abbildung 14) wurden aus Glycerol-stocks mit denselben Cotransformanden wie die Experimente zur Aktivitätsbestimmung des Reporters für die Rev-Rev-Interaktion und Negativkontrollen (Abbildung 15) durchgeführt. Somit wurde auch gezeigt, daß in den Negativkontrollen pBT-Rev/pTRG und pBT/pTRG-Rev tatsächlich die entsprechenden Rev-Fusionsproteine exprimiert wurden (siehe Abbildung 14, Spur 1 bzw. Spur 2).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Rev im bakteriellen Zwei-Hybrid-System als Fusionsprotein der zu erwartenden Größe exprimiert wird und daß Rev nur zusammen mit einem Interaktionspartner den Reporter aktiviert. Somit ist Rev geeignet für das Screening einer cDNA-Bibliothek mit dem bakteriellen Zwei-Hybrid-System.

3.1.2 Ermittlung der besten Bedingungen für das Library-Screening mit BMII-Zellen

Für das Screening einer cDNA-Bibliothek auf Rev-Interaktoren im bakteriellen Zwei-Hybrid-System müssen die optimalen Rahmenbedingungen ermittelt werden. So müssen Bedingungen gefunden werden, bei denen v.a. die Anzahl der falsch positiven Kolonien beim Screening einer großen cDNA-Bibliothek überschaubar ist. Dabei gibt es die folgenden Parameter, die beim Gießen der Selektionsplatten verändert werden können:

- IPTG-Konzentration: je höher die IPTG-Konzentration ist, desto mehr Bait- und Target-Plasmide werden in den Bakterienzellen exprimiert (Target-Plasmide jeweils ca. 2-3fach mehr als Bait-Plasmide);
- 3-AT-Konzentration: 3-AT ist ein Kompetitor zum His3-Enzym, das als Reporter in BMII-Zellen exprimiert wird und das Wachstum auf His-Mangelmedium erlaubt.

Zur IPTG-Konzentration: Niedrige IPTG-Konzentrationen selektieren auf starke Interaktionspartner, da nur Bait- und Target-Moleküle mit einer hohen Affinität füreinander auch bei niedrigen Konzentrationen innerhalb der Bakterienzelle stabil genug miteinander interagieren, um den Reporter zu aktivieren. Bei hohen IPTG-Konzentrationen können toxische Effekte aufgrund der Überexpression von Bait oder Target bewirken, daß die Reporteraktivität wieder sinkt. So konnte für

die Rev-Rev-Positivkontrolle die optimale IPTG-Konzentration bei 20 μM IPTG ermittelt werden (siehe Abbildung 15). Diese relativ niedrige IPTG-Konzentration, die daher auch gut geeignet ist, Interaktionspartner hoher Affinität zu finden, wurde im folgenden auch für das Screening der cDNA-Bibliothek verwendet.

Zur 3-AT-Konzentration: Je höher die 3-AT-Konzentration in den Selektionsplatten ist, desto stringenter ist das Screening, d.h. auf um so stärker interagierende Partner wird selektiert und um so weniger falsch Positive sind zu erwarten. Andererseits könnten die Bedingungen aber auch zu stringent sein, so daß keine mit Rev interagierenden Proteine gefunden werden können. Deshalb muß die optimale 3-AT-Konzentration ermittelt werden.

Tabelle 2: Auswirkung verschiedener IPTG- und 3-AT-Konzentrationen auf den zu erwartenden Anteil falsch positiver Kolonien. BMII-Zellen wurden mit Plasmiden wie angegeben transformiert und auf M9-HisDO-Agarplatten verschiedener IPTG- und 3-AT-Konzentrationen (Selektivplatten) und parallel auf M9-HisDO-Agarplatten (Permissivplatten) ausplattiert. Da es sich bei den gewählten Plasmid-Kombinationen jeweils um Negativkontrollen handelt, die auf Selektivplatten nicht wachsen dürften, gibt der Anteil der auf Selektivplatten im Vergleich zu auf Permissivplatten wachsenden Kolonien den zu erwartenden Anteil falsch positiver Kolonien unter den jeweils gewählten Selektionsbedingungen an.

	IPTG	% Wachstum Selektivplatten von Permissivplatten				
		mM 3-AT:	2	3	4	5
pBT-Rev / pTRG	10 μM		1,95	0,11	0,05	0,00
	20 μM		0,82	0,20	0,00	0,02
	35 μM		0,08	0,03	0,00	0,00
	50 μM		0,00	0,00	0,00	0,00
pBT / pBT-Gal11p	10 μM		1,19	0,04	0,00	0,00
	20 μM		0,34	0,09	0,01	0,00
	35 μM		0,56	0,03	0,01	0,00
	50 μM		0,15	0,02	0,00	0,00

Der kombinierte Effekt der IPTG- und 3-AT-Konzentration auf den zu erwartenden Anteil der falsch positiven Kolonien wurde in Tabelle 2 untersucht. Dazu wurden als Selektivplatten M9-HisDO Agarplatten mit unterschiedlichen IPTG- und 3-AT-Konzentrationen gegossen. Parallel dazu wurden als Permissivplatten M9-HisDO

Agarplatten gegossen, die ebenfalls unterschiedliche IPTG-Konzentrationen, aber kein 3-AT enthielten. Auf diese Agarplatten wurden dann BMII-Zellen, die zuvor mit pBT-Rev und pTRG bzw. pBT und pTRG-Gal11p Plasmiden transformiert wurden, ausplattiert. Bei diesen Bait-Target-Kombinationen handelt es sich um Negativkontrollen, die nicht miteinander interagieren können. Daher stellen Kolonien, die auf Selektivplatten wachsen, falsch Positive dar. Der Anteil der falsch positiven Kolonien in % wurde aus dem Quotienten der auf Selektivplatten im Vergleich zu auf Permissivplatten gewachsenen Kolonien berechnet, siehe Tabelle 2. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß, daß der Anteil der falsch Positiven abnahm je höher die 3-AT-Konzentration war (höhere Stringenz). Ebenso nahm der Anteil der falsch Positiven mit steigender IPTG-Konzentration ab, was mit zunehmender Toxizität bei stärkerer Expression der Bait- und Target-Plasmide erklärt werden kann. Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben von Stratagene zum BacterioMatch-System überein.

Damit ein cDNA-Screening durchgeführt werden kann, bei dem selektiv die stärksten Rev-Interaktoren gefunden werden, wurden folgende Screening-Bedingungen gewählt:

- 5 mM 3-AT: ist die höchste vom Hersteller des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems (BacterioMatch, Stratagene) vorgeschlagene Konzentration und erlaubt Screening mit höchster Stringenz;
- 20 µM IPTG: stellt den optimalen Wert für ein Screening mit pBT-Rev dar, wie schon in vorangegangenen Experimenten ermittelt, siehe Abbildung 15.

Bei diesen Bedingungen wurde in Tabelle 2 ein Wert von 0,2 % erreicht, der offensichtlich einen Ausreißer darstellt, da ansonsten mit 5 mM 3-AT bei allen IPTG-Konzentrationen ein Wert von 0 % erreicht wird, siehe auch Tabelle 3.

Für das eigentliche cDNA-Screening wurden frische Selektivplatten mit 20 µM IPTG und 5 mM 3-AT gegossen. Um den Anteil der mit dieser Charge an Agarplatten zu erwartenden falsch Positiven genau berechnen zu können, wurden einige der Agarplatten verwendet und BMII-Zellen mit den als Negativkontrolle dienenden Bait-/Target-Plasmidkombinationen darauf und zusätzlich auf Permissivplatten ausplattiert, siehe Tabelle 3. Dabei wurde nach den Empfehlungen von Stratagene vorgegangen und ein Verdünnungsfaktor von 1:100 auf den Permissivplatten gewählt. Dieses Experiment diente gleichzeitig dazu, die Integrität der gegossenen Agarplatten sicherzustellen.

In Tabelle 3 wurde der zu erwartende Anteil falsch positiver Kolonien durch Division der Anzahl der auf Selektivplatten gewachsenen Kolonien durch die Anzahl der Kolonien auf Permissivplatten unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet. Da auf den Selektivplatten jeweils keine Kolonie wuchs, wurde hier jeweils die Koloniezahl 1 angenommen. So ergab sich ein zu erwartender Anteil falsch positiver Kolonien von weniger als 0,006 %. Das bedeutet bei einem Screening einer cDNA-Bibliothek der Größe von ca. $2,1 \cdot 10^6$ cfu maximal 126 zu erwartende falsch Positive.

Tabelle 3: Genaue Bestimmung der mit den im Library-Screening verwendeten Agarplatten zu erwartenden falsch Positiven. BMII-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmid-Kombinationen co-transformiert und parallel zum einen auf Permissivplatten 1:100 und auf Selektionsplatten (20 μ M IPTG, 5 mM 3-AT M9 HisDO) ausplattiert. Da beide Plasmid-Kombinationen Negativkontrollen darstellen, gibt die Spalte „%“ den zu erwartenden Anteil falsch positiver Kolonien an.

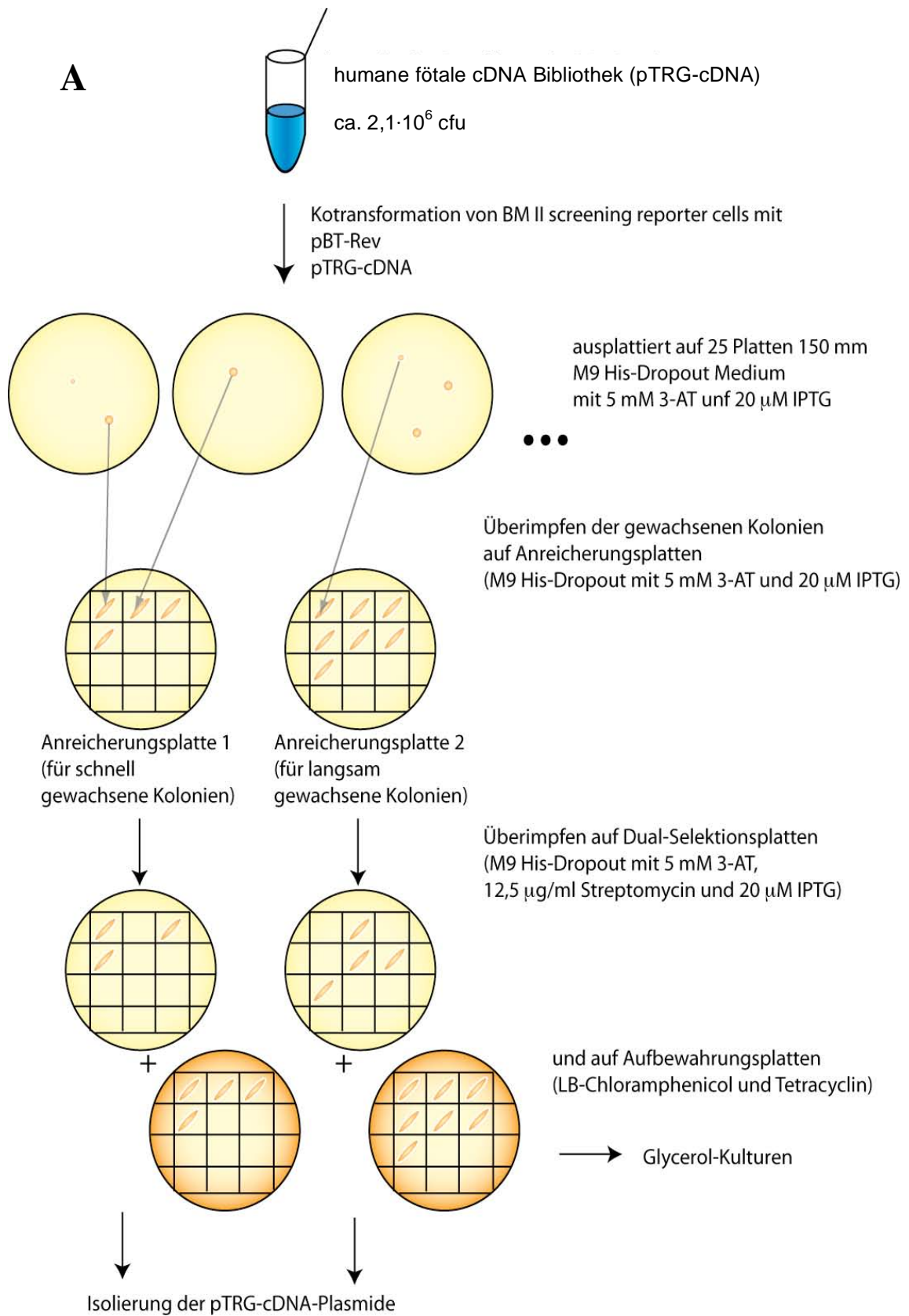
		Gewachsene Kolonien		falsch Positive %
		Selektivplatten	Permissivplatten (1:100)	
pBT	/ pTRG-Gal11p	0	161	< 0,006 %
pBT-Rev	/ pTRG	0	222	< 0,005 %

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß die besten Bedingungen für das cDNA-Bibliothek-Screening auf Rev-Interaktoren 20 μ M IPTG und 5 mM 3-AT darstellen. Unter diesen Bedingungen kann das Screening mit voller Stringenz auf starke Rev-Interaktoren durchgeführt werden, wobei auch potentiell in Bakterien toxische Interaktionspartner identifiziert werden können. Unter diesen Bedingungen ist mit maximal ca. 126 falsch Positiven zu rechnen (bei einem Screening einer cDNA-Bibliothek der Größe von ca. $2,1 \cdot 10^6$ cfu).

3.1.3 Screening einer humanen fötalen cDNA-Bibliothek aus Gehirn auf Rev-Interaktoren

Es wurde eine cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn auf Rev-Interaktoren im bakteriellen Zwei-Hybrid-System gescreent. Diese Bibliothek wurde von der Firma Stratagene bezogen und enthielt die cDNA-Inserts bereits in pTRG-Plasmiden, siehe 2.3.3. Diese cDNA-Bibliothek wurde, wie in 2.3.4 beschrieben, geerntet, und die pTRG-cDNA Plasmide wurden isoliert.

Abbildung 16 zeigt schematisch den Ablauf des Screenings. Zunächst wurden BMII-Zellen mit pBT-Rev und der cDNA-Bibliothek als pTRG-cDNA co-transformiert und auf insgesamt 25 M9 HisDO-Platten mit 150 mm Durchmesser mit je 20 μM IPTG und 5 mM 3-AT ausplattiert. Die dafür notwendige Anzahl an BMII-Zellen und die der Agarplatten wurde zuvor in einer Pilot-Cotransformation ermittelt. So stellte sich heraus, daß für die gewünschte theoretisch ausplattierte Anzahl an Bakterien von $2,1 \cdot 10^6$ cfu 25 Agarplatten von 150 mm Durchmesser nötig sind, wobei auf jeder Agarplatte theoretisch berechnete $8,4 \cdot 10^4$ cfu Bakterien ausplattiert wurden. Damit sind nach Angaben von Stratagene die Bakterien nicht zu dicht ausplattiert, so daß jede individuelle Kolonie theoretisch hochwachsen kann. Die auf diesen Screening-Platten gewachsenen Kolonien wurden auf sog. Anreicherungsplatten, Agarplatten mit gleicher Zusammensetzung wie die Screening-Platten, überimpft. Dabei wurden Kolonien, die innerhalb von 1 oder 2 Tagen wuchsen, auf Anreicherungsplatte 1 überimpft. Diese Kolonien wurden als „B1“-Kolonien bezeichnet und stellen, da sie relativ schnell gewachsen sind, diejenigen potentiellen Rev-Interaktoren dieses Screenings der cDNA-Bibliothek dar, bei denen die Wahrscheinlichkeit für eine relativ starke Interaktion mit Rev am höchsten ist. Kolonien, die langsamer wuchsen, wurden bis zu 7 Tage nach dem Ausplattieren auf Anreicherungsplatte 2 überimpft und stellen als sog. „B2“-Kolonien potentielle Rev-Interaktoren dar, die entweder schwächer mit Rev interagieren oder Proteine exprimieren, die in Bakterien toxisch sind. Die auf beiden Anreicherungsplatten gewachsenen Kolonien wurden jeweils auf Dual-Selektionsplatten mit zusätzlich 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, was Selektion durch das zweite Reportergen bewirkte, überimpft. Es wuchsen hier 31 B1-Kolonien und 117 B2-Kolonien. Von diesen Kolonien wurden nach Überimpfen auf LB-Chloramphenicol/Tetracyclin-Platten Glycerol-stocks angelegt.



Fortsetzung nächste Seite

B

Isolierung der pTRG-cDNA-Plasmide

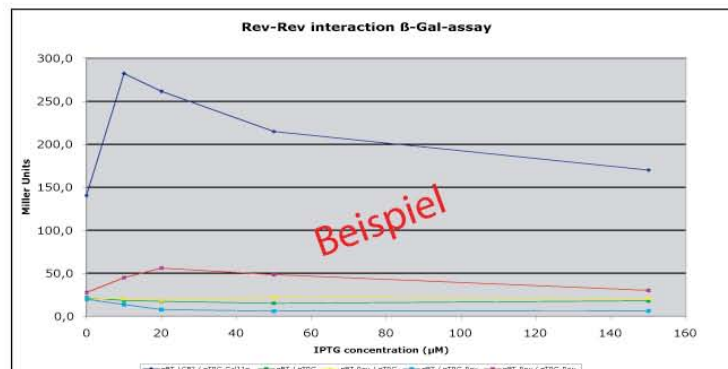
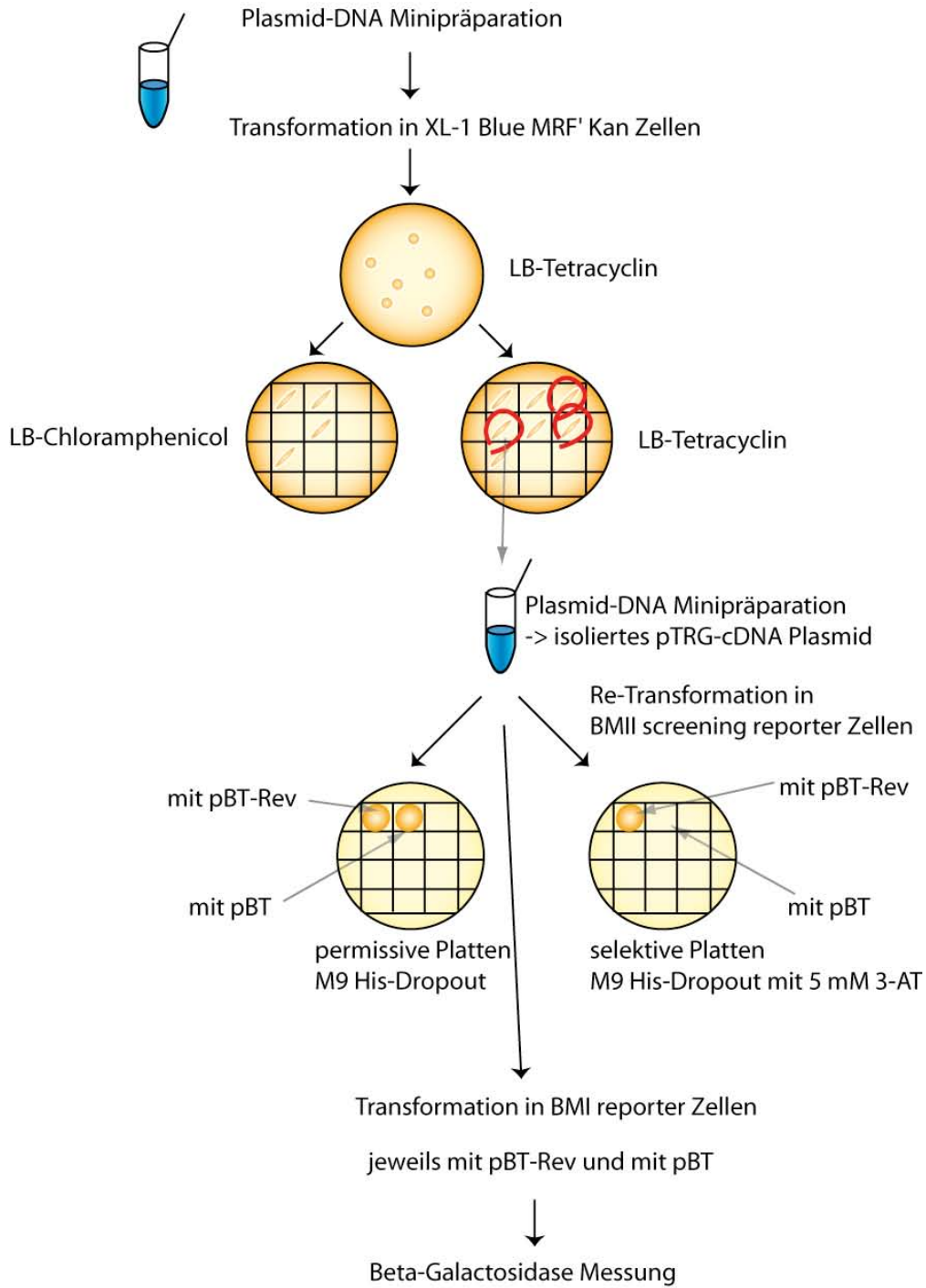


Abbildung 16: Schematischer Ablauf des Library-Screenings. **A:** BMII screening competent cells wurden co-transformiert mit pBT-Rev und der Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn (pTRG-cDNA) mit einer theoretischen Größe von ca. $2,1 \cdot 10^6$ cfu. Die transformierten Zellen wurden auf 25 HisDO Selektivplatten mit je 5 mM 3-AT und 20 μ M IPTG ausplattiert. Schnell gewachsene Kolonien wurden auf Anreicherungsplatte 1 überimpft („B1-“ Kolonien) und langsamer wachsende Kolonien auf Anreicherungsplatte 2 („B2-“ Kolonien). Anschließend wurden von beiden Platten die Kolonien auf Doppel-Selektionsplatten, die zusätzlich 12,5 μ g/ml Streptomycin enthielten, überimpft. Von den hier gewachsenen Kolonien wurden Glycerol-stocks angefertigt. **B:** Die pTRG-cDNA Plasmide wurden wie im Text beschrieben von den pBT-Rev-Plasmiden getrennt und isoliert. Mit den isolierten pTRG-cDNA Plasmiden wurden neue Co-Transformationen in BMII-Zellen und BMI-Zellen durchgeführt, um die Interaktion mit Rev zu bestätigen. Dabei wurde jeweils leeres pBT-Plasmid und pBT-Rev eingesetzt, um festzustellen, ob die Interaktion spezifisch nur mit Rev stattfindet.

Um die Spezifität der Interaktion mit Rev zu überprüfen und um falsch Positive auszuschließen, wurden die pTRG-cDNA-Plasmide aus den gewachsenen Kolonien isoliert und erneut im bakteriellen Zwei-Hybrid-System auf Interaktion mit pBT-Rev untersucht, siehe Abbildung 16 B. Zunächst mußten die pTRG-cDNA Plasmide von den pBT-Rev-Plasmiden getrennt werden. Dazu wurden von allen Kolonien Plasmid-DNA-Minipräparationen angefertigt und mit dieser Plasmid-DNA (Gemisch aus pBT-Rev und pTRG-cDNA) XL1-Blue MRF'-Zellen transformiert. Diese Bakterien wurden in LB-Tetracyclin Medium hochgezogen, so daß die pBT-Rev-Plasmide (Chloramphenicol-Resistenz) verloren gehen, und auf LB-Tetracyclin-Agarplatten (Selektion nur auf pTRG-cDNA Plasmide) ausplattiert, Kolonien von diesen LB-Tetracyclin-Agarplatten wurden anschließend mit der Technik der Replikaplattierung parallel auf LB-Chloramphenicol-Platten und LB-Tetracyclin-Platten ausplattiert. Nur die auf LB-Tetracyclin und nicht gleichzeitig auf LB-Chloramphenicol wachsenden Kolonien enthielten isolierte pTRG-cDNA Plasmide. Von diesen Bakterien wurde erneut eine Plasmid-DNA-Minipräparation durchgeführt. Um die Anzahl der Proben zu reduzieren, wurden zunächst Kolonien mit identischen pTRG-cDNAs identifiziert, siehe Abbildung 17. Anschließend wurde überprüft, ob das gefundene pTRG-cDNA Plasmid spezifisch mit pBT-Rev interagiert. Dazu wurden neue BMII-Zellen mit dem isolierten pTRG-cDNA Plasmid und jeweils mit pBT-Rev und leerem pBT co-transformiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Spezifische Rev-Interaktoren können nur mit pBT-Rev wachsen, nicht aber mit leerem pBT. In einer weiteren Runde wurde auch das Wachstum auf Dual-Selektionsplatten untersucht, siehe Tabelle 4. Auf diese Weise stellte sich heraus, daß von den 31 B1-Kolonien 29 und von den 117 B2-Kolonien 27 spezifische Rev-Interaktoren waren. Die Interaktion mit Rev wurde anschließend genauer im β -Galactosidase-Assay untersucht, siehe 3.2.1.

Tabelle 4: Überprüfung der B1-Kolonien auf spezifische Interaktion mit pBT-Rev. Spalte A gibt die beim primären Screening auf Selektionsplatten aufgetretene Koloniegröße an (von klein: „*“ bis groß: „***“); in Spalten B bis E werden die Ergebnisse des sekundären Screenings wiedergegeben – nach der Isolierung der pTRG-cDNA Plasmide wurden erneut leere BMII-Reporterzellen mit diesen Plasmiden und jeweils mit pBT-Rev oder leerem pBT co-transformiert; Spalte B zeigt, ob die Cotransformanden auf Permissivplatten wachsen konnten, und zeigt damit an, ob die Cotransformation erfolgreich war; Spalten C und D zeigen, ob Wachstum der Cotransformanden auf Selektionsplatten stattgefunden hat – dabei wurden bei den Cotransformanden mit Rev zunächst 12 µl der Suspension an cotransformierten Bakterien aufgetropft – wenn kein Wachstum zu beobachten war, wurden 200 µl ausplattiert und die Platten für 1 bzw. 3 Tage beobachtet; Spalte E gibt Wachstum auf Dual-Selektionsplatten wieder und ist analog zu Spalte D; Spalte F zeigt die Insertgröße der pTRG-B1 Plasmide nach Verdau durch die Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI.

Die rot eingekreiste Kolonie stellt den einen im Weiteren charakterisierten neuen Rev-Interaktor B1-1 dar. Die mit rotem Pfeil markierte Kolonie B1-7 stellt eine falsch positive Kolonie dar.

„+“ bedeutet Wachstum; „-“ bedeutet kein Wachstum.

	primäres Screening			sekundäres Screening: Re-Transformation							F		
	A			B		C	D			E			
	5 mM 3-AT und 12,5 µg/ml Strep			Permissivplatten		ohne Rev	5 mM 3-AT			5 mM 3-AT + 12,5 µg/ml Strep			
	Koloniegröße nach Wachstum für			ohne Rev	mit Rev	ohne Rev	mit Rev			mit Rev			
	24 h	48 h	16 d				Volumen aufgetragene Bakteriensuspension		Volumen aufgetragene Bakteriensuspension		Größe cDNA		
							12 µl	200 µl	200 µl	12 µl	200 µl	200 µl	Verdau mit
#B1-							1d	3d		1d	7d	EcoRI / XhoI	
1	**	***	***	+	+	-	+			+			1,1
2	*	**	**	+	+	-	+			+			1,1
3	*	**	**	+	+	-	+			+			1,1
4	*	*	**	+	+	-	+			+			1,1
5	**	***	***	+	+	-	+			+			1,05
6	*	*	**	+	+	-	+			+			1,1
7	*	*	**	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0,48
9	*	*	*	+	+	-	+			+			1,1
10	*	*	*	+	+	-	+			+			1,05
12	**	***	***	+	+	-	+			+			1,1
13	*	*	*	+	+	-	+			+			1,1
14	**	***	***	+	+	-	+			+			1,1
17	**	***	***	+	+	-	+			+			1,1
18	*	*	**	+	+	-	-	-	+	-	-	+	
20	**	**	**	+	+	-	+			+			1,1
21	**	**	**	+	+	-	+			+			1,05
23	*	*	*										
25	**	***	***	+	+	-	+			+			1,1
27	*	*	*	+	+	-	-	+	+	-	+	+	1,1
28	*	*	**	+	+	-	+			+			1,1
29	*	*	**	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1,2
31	**	**	***	+	+	-	+			+			1,1

Tabelle 4 zeigt die weitere Analyse der gefundenen B1-Kolonien. Spalte A zeigt die Stärke des Wachstums auf Dual-Selektionsplatten im cDNA-Bibliothek-Screening. Nachdem die pTRG-cDNA Plasmide von den pBT-Rev-Plasmiden getrennt wurden, s.o., wurde zunächst die Größe des cDNA-Inserts in pTRG-cDNA durch Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und XhoI ermittelt, siehe Tabelle 4 Spalte F. Spalten B bis E zeigen die Ergebnisse der Retransformationen. Hier wurden leere BMII-Reporterzellen cotransformiert, einerseits mit den isolierten pTRG-cDNA Plasmiden und pBT-Rev, andererseits mit den isolierten pTRG-cDNA Plasmiden und leerem pBT-Plasmid. Wachstum auf Permissivplatten (Spalte B) zeigt an, daß die Transformationen erfolgreich waren. Für Rev-spezifische Interaktoren darf kein Wachstum auf Selektivplatten mit leerem pBT

zu beobachten sein, was bei allen Proben der Fall war, siehe Spalte C. Dagegen muß zusammen mit pBT-Rev Wachstum auftreten, siehe Spalte D. Das wurde überprüft, indem zunächst 12 µl der Bakteriensuspension auf Selektivplatten aufgetropft wurden. In den meisten Fällen war dies ausreichend. Falls aber noch kein Wachstum zu sehen war, wurden die Bakterien jeweils auf einer Selektivplatte ausplattiert (200 µl) und bis zu 3 Tage beobachtet. In Tabelle 4 ist ein Beispiel einer falsch positiven Probe markiert (siehe roter Pfeil, Probe B1-7). Diese Probe zeigt keine reproduzierbare Interaktion mit Rev. In gleicher Weise wurde mit den B2-Proben verfahren.

In Abbildung 17 ist ein Beispiel für die Restriktionsanalysen eines Teils der B2-Proben dargestellt. Der Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI zeigt die Größe des cDNA-Inserts in pTRG-cDNA an, siehe auch Tabelle 4 Spalte F. Proben mit gleicher Insertgröße wurden weiter miteinander durch Restriktionsverdau mit AluI verglichen. So ist in Abbildung 17 B ein Beispiel eines AluI-Verdau zweier Proben gleicher Insertgröße (siehe Pfeile in Abbildung 17 A) dargestellt. Hier zeigte sich, daß die Proben trotz gleicher Insertgröße verschieden sind, und daher wurden beide Proben weiter analysiert, wie oben beschrieben.

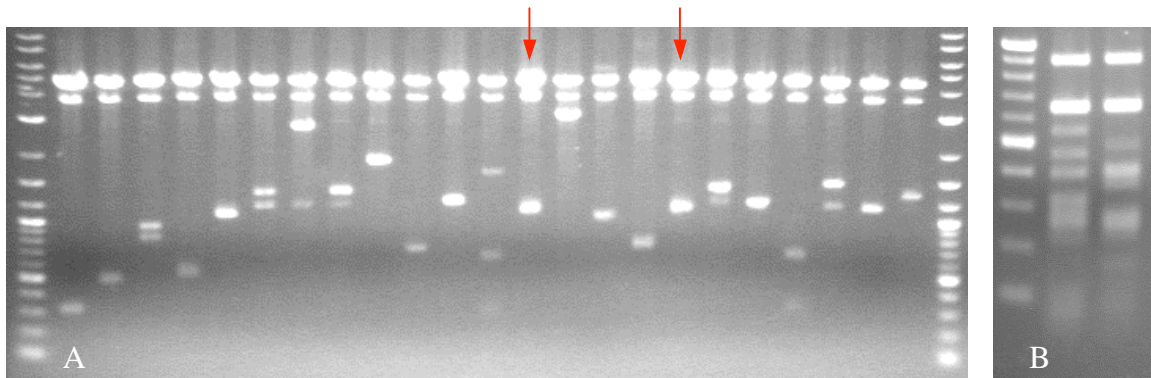


Abbildung 17: Beispiel für die Restriktionsanalyse der isolierten pTRG-cDNA Plasmide. A) Gleichzeitiger Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI zeigt die Größe der cDNA-Inserts in pTRG-cDNA – hier dargestellt für einen Teil der B2-Proben. B) Proben mit gleicher Insertgröße wurden mit dem Restriktionsenzym AluI verdaut – in dem hier gezeigten Beispiel zeigt sich ein unterschiedliches Bandenmuster trotz gleicher Insertgrößen (Pfeile in A).

Nach der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden 2 Proben ausgewählt, die reproduzierbar mit Rev interagierten: B1-1 und B2-92. Es wurden deshalb 2 Proben gewählt und weiter untersucht, da bei nur einer Probe die Gefahr bestünde, daß diese Probe in den weiteren Analysen unvorteilhafte Eigenschaften zeigen

könnte – andererseits wäre es für mehr als 2 Proben nicht möglich, alle Faktoren im Rahmen dieser Arbeit genauer zu analysieren.

B1-1 wurde gewählt, da es am häufigsten auf der Agarplatte des B1-Screenings vertreten war und die Kolonien schnell wuchsen. Das deutet darauf hin, daß es sich bei B1-1 mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen für Bakterien nicht toxischen und starken Rev-Interaktor handelt. Es wuchsen von 31 Kolonien der B1-Screening Agarplatte 22 Kolonien auf Dual-Selektionsplatten; dabei war B1-1 14 mal vertreten, 2 mal in einer um 19 Aminosäuren aminoterminal kürzeren Version als B1-1, und es traten 6 falsch Positive auf.

Auf den B2-Screening Agarplatte wuchsen insgesamt 112 Kolonien, aber nur 27 zeigten Wachstum auf Dual-Selektionsplatten. Davon wurden 22 Kolonien untersucht. Dabei war B2-92 2 mal vertreten, B1-1 3 mal vertreten, und es traten 17 falsch Positive auf.

Tabelle 5 zeigt die wichtigsten Daten zu diesen Proben. Beide sind in der Literatur noch nicht als Rev-Interaktoren beschrieben. Die zugehörigen Proteine voller Länge sind bei beiden Proben bekannt.

B1-1:

Die Probe B1-1 stammt vom Protein Glutathion-S-Transferase A4 (GST A4) ab. In pTRG-B1-1 werden die Aminosäuren 42 bis 222 aus GST A4 im richtigen Leserahmen exprimiert.

B2-92:

Die Probe B2-92 stammt vom Protein vacuolar protein sorting 28 (yeast) (VPS 28) ab. In pTRG-B2-92 werden die Aminosäuren 17 bis 221 aus VPS 28 im richtigen Leserahmen exprimiert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß beim Screening einer humanen fötalen cDNA-Bibliothek aus Gehirn zwei neue Rev-interagierende Faktoren identifiziert wurden: B1-1 und B2-92. B1-1 stammt vom Protein Glutathion-S-Transferase A4 (GST A4) und B2-92 von vacuolar protein sorting 28 (yeast) (VPS 28) ab.

Tabelle 5: Wichtige Daten der neu identifizierten Rev-Interaktoren.

1. Faktor: B1-1	
Bezeichnung des zugehörigen Proteins voller Länge (nach HUGO Gene Nomenclature Committee)	Glutathion-S-Transferase A4 – GST A4
GST A4 GeneID:	2941
Lokalisation im humanen Genom	Chromosom: 6; 6p12.1
BLAST accession nr (GST A4 mRNA)	NM_001512
Aminosäuren GST A4	222
Aminosäuren B1-1	181
Protein Größe GST A4 (berechnet)	25,7 kD
Protein Größe B1-1 (berechnet)	21,0 kD
pI von GST A4 (berechnet)	8,1
pI von B1-1 (berechnet)	8,64

2. Faktor: B2-92	
Bezeichnung des zugehörigen Proteins voller Länge (nach HUGO Gene Nomenclature Committee)	vacuolar protein sorting 28 (yeast) – VPS 28
VPS 28 GeneID:	51160
Lokalisation im humanen Genom	Chromosom: 8; 8q24.3
BLAST accession nr (VPS 28 mRNA)	NM_016208
Aminosäuren VPS 28	221
Aminosäuren B2-92	205
Protein Größe VPS 28 (berechnet)	25,4 kD
Protein Größe B2-92 (berechnet)	23,9 kD
pI von VPS 28 (berechnet)	5,21
pI von B2-92 (berechnet)	5,09

3.2 Charakterisierung der neu identifizierten Rev-Interaktoren

3.2.1 Charakterisierung in bakteriellen Zellen

Da im bakteriellen Zwei-Hybrid-System die Reporteraktivität proportional zur Interaktionsstärke der Interaktionspartner ist (Shaywitz et al. 2002; Dove et al. 1997), eignet sich dieses System gut zur Ermittlung der Interaktionsstärken der Faktoren mit Rev.

Im folgenden wird mit „Interaktionsstärke“ die im β -Galactosidase-Assay des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems BacterioMatch ermittelte relative Interaktionsstärke bezeichnet.

3.2.1.1 Bestimmung der relativen Interaktionsstärken der neu identifizierten Faktoren mit Rev im β -Galactosidase-Assay

Ziel dieser Arbeit war es, neue Rev-Interaktoren aus einer cDNA-Bibliothek zu identifizieren, wobei mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit diejenigen Rev-Interaktoren aus dieser cDNA-Bibliothek gefunden werden sollten, die Rev relativ stark binden. Die Interaktionsstärke mit Rev wurde ermittelt, indem BMI-Zellen mit den Interaktionspartnern (pBT-Rev und der auf Interaktion zu testende Faktor in pTRG) co-transformiert wurden und die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt wurde, siehe 2.2.5.

In Abbildung 18 ist zu sehen, daß der Faktor B2-92 stärker mit Rev interagiert als Rev mit sich selbst. Der Faktor B1-1 interagiert noch stärker mit Rev – ca. doppelt so stark wie Rev mit sich selbst. Somit ist das Ziel, starke Rev-Interaktoren zu finden, erfüllt. Abbildung 18 zeigt weiterhin, daß alle Interaktionen mit Rev spezifisch sind, d.h. nur mit pBT-Rev den Reporter aktivieren – mit leerem pBT jedoch lediglich eine Basalaktivität des Reporters zeigen.

Um zu überprüfen, ob die pTRG-Plasmide, v.a. die der Negativkontrollen, wie gewünscht exprimiert werden, wurden stichprobenartig von co-transformierten BMI-Zellen die pBT- und pTRG-Plasmide isoliert und durch Restriktionsanalysen oder Sequenzierung untersucht. Dabei stellte sich stets heraus, daß die BMI-Zellen die gewünschten Plasmide tatsächlich enthielten. Außerdem wurde überprüft, daß im Medium, das Chloramphenicol und Tetracyclin enthielt, tatsächlich nur BMI-Zellen wachsen können, die beide Plasmide, pBT- und pTRG-, enthiel-

ten. Da keine Antikörper verfügbar sind, die im Westernblot eindeutig die Expression der pTRG-Plasmide zeigen, war eine Expressionskontrolle auf diese Weise nicht möglich.

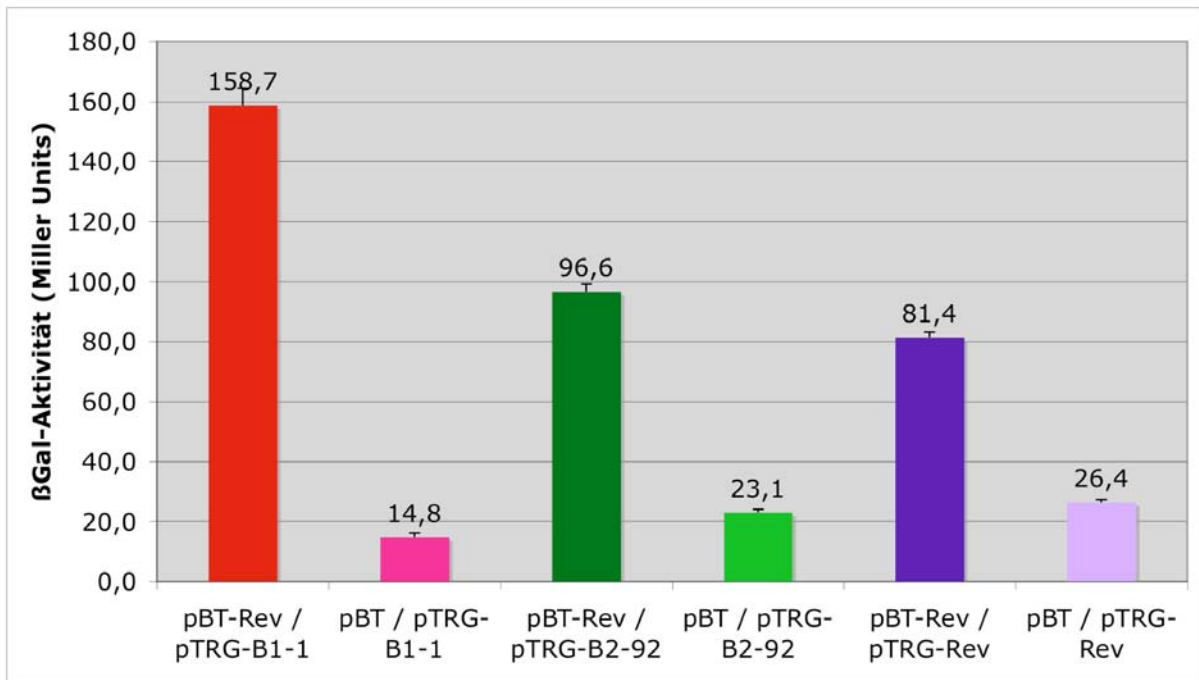


Abbildung 18: Interaktionsstärken der Faktoren B1-1 und B2-92 mit Rev. BMI-Zellen wurden mit den entsprechenden pBT- und pTRG-Plasmiden co-transformiert. Dargestellt ist jeweils die Interaktion des Faktors mit pBT-Rev als auch mit leerem pBT. Die angegebenen Werte resultieren aus 3 unabhängigen Co-Transformationen.

Bei einem cDNA-Screening werden sehr häufig Proteine gefunden, die im Vergleich zu dem korrespondierenden im Gewebe exprimierten Protein N-terminal trunziert sind (siehe 4.3.1, Abbildung 33). Daher wurden für die beiden Faktoren B1-1 und B2-92 die codierenden Sequenzen der korrespondierenden Proteine voller Länge mit synthetischen Oligonukleotiden erzeugt, so daß die Plasmide pTRG-GST A4 (von B1-1) und pTRG-VPS 28 (von B2-92) resultierten. Die Interaktionsstärken der von diesen Plasmiden exprimierten Proteine GST A4 und VPS 28 mit Rev wurden im β-Galactosidase-Assay untersucht.

Abbildung 19 zeigt die Interaktionen von B1-1 mit Rev und im Vergleich dazu die Interaktion des korrespondierenden Proteins voller Länge GST A4 mit Rev. Dabei zeigt sich, daß GST A4 offensichtlich im bakteriellen Zwei-Hybrid-System nicht mit Rev interagiert.

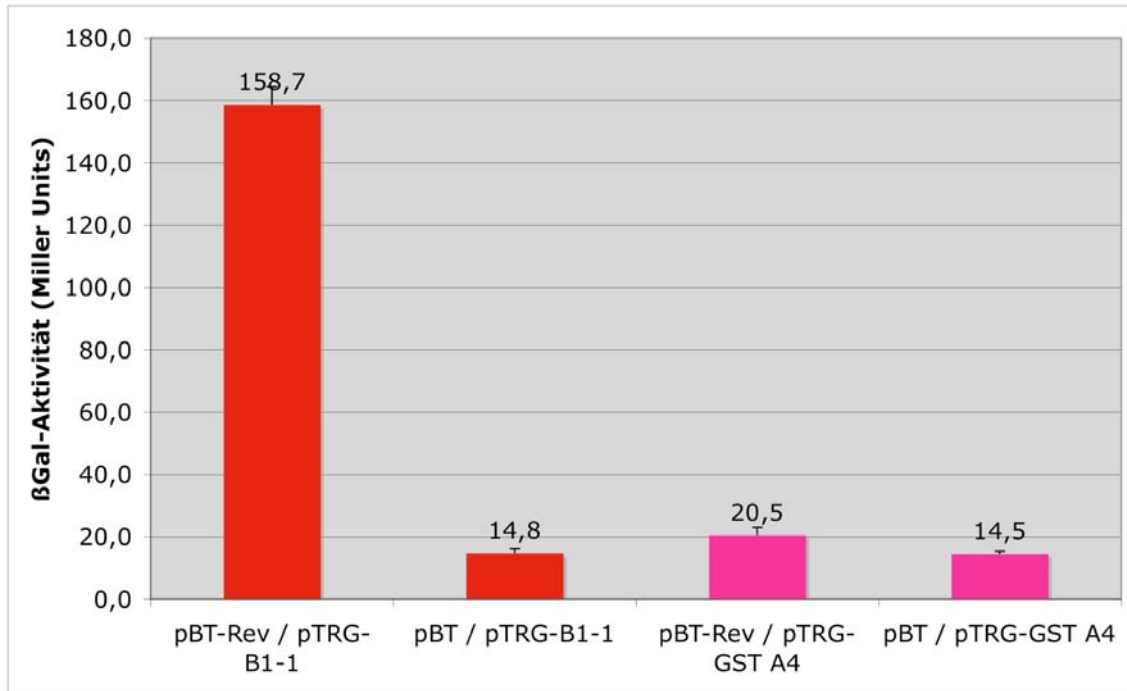


Abbildung 19: Interaktionsstärken von B1-1 und dem korrespondierenden Protein voller Länge GST A4 mit Rev. BMI-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden co-transformiert, und die β-Galactosidase-Aktivitäten bestimmt. Die angegebenen Werte resultieren aus 3 unabhängigen Co-Transformationen.

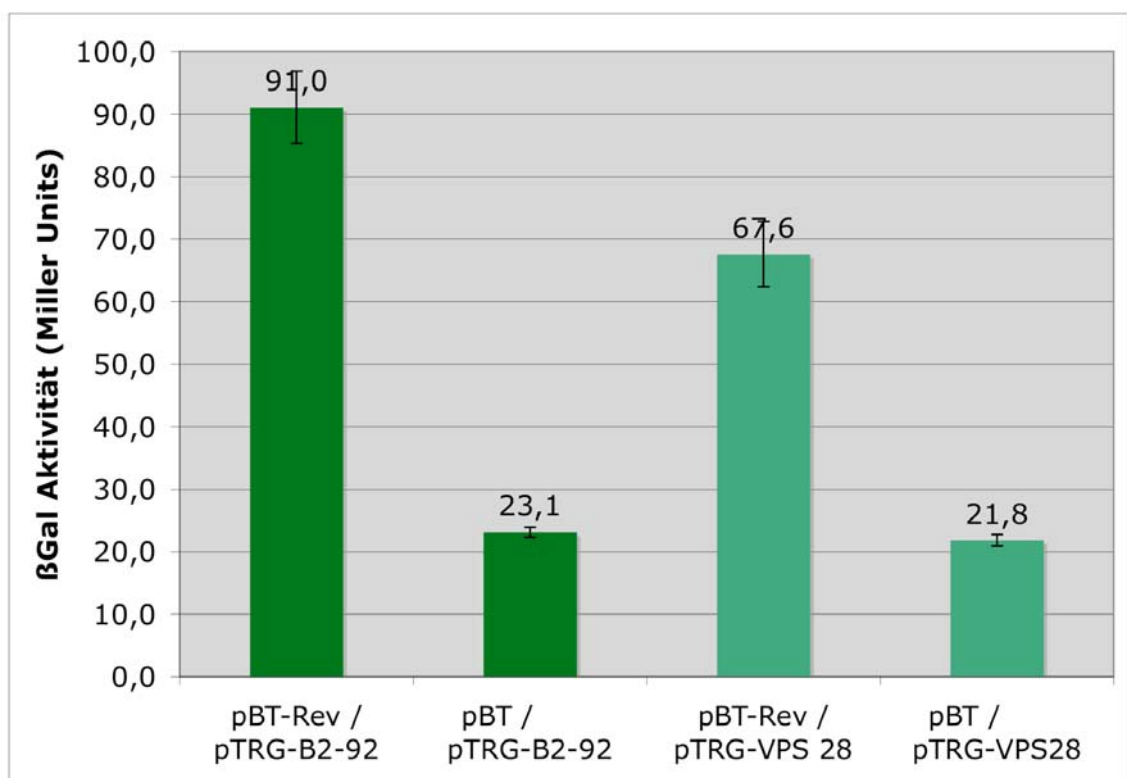


Abbildung 20: Interaktionsstärken von B2-92 und dem korrespondierenden Protein voller Länge VPS 28 mit Rev. BMI-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden co-transformiert, und die β-Galactosidase-Aktivitäten bestimmt. Die angegebenen Werte resultieren aus 3 unabhängigen Co-Transformationen.

Analog wurden die Interaktionsstärken von B2-92 im Vergleich zum korrespondierenden Protein voller Länge VPS 28 mit Rev untersucht, siehe Abbildung 20. Dabei zeigte sich, daß VPS 28 ebenfalls wie B2-92 mit Rev interagiert, allerdings etwas schwächer.

3.2.1.2 Charakterisierung der interagierenden Domänen in Rev

Anschließend wurde untersucht, mit welchen Domänen im Rev-Protein die neu identifizierten Faktoren B1-1 und B2-92 interagieren. Die Domänen-Organisation des Rev-Proteins ist schematisch in Abbildung 21 dargestellt, siehe auch 1.2.2. Kurz zusammengefaßt: im N-terminalen Bereich befindet sich das NLS-Signal, das nukleäre Lokalisation vermittelt, sowie das Arginin-reiche Motiv (ARM), das für Bindung an die virale mRNA verantwortlich ist. Zu beiden Seiten dieses Bereichs liegt die Oligomerisierungsdomäne – Aminosäuren 11 bis 67 nach Thomas et al. (1998). Im C-terminalen Bereich liegt das Signal für den Kernexport (NES). Wie in Abbildung 21 gezeigt, wurden folgende Fragmente des Rev-Proteins erzeugt:

Fragment	Enthaltene Domänen
Rev	Volle Länge
Rev 1 - 54	Enthält NLS + ARM, aber nicht die vollständige Oligomerisierungsdomäne
Rev 54 - 116	Enthält das NES (komplementäres Fragment zu Rev 1 - 54)
Rev 11 - 67	Enthält NLS + ARM sowie die Oligomerisierungsdomäne nach Thomas et al. (1998)
Rev 1 - 75	Enthält NLS + ARM sowie die Oligomerisierungsdomäne inklusive benachbarter Bereiche

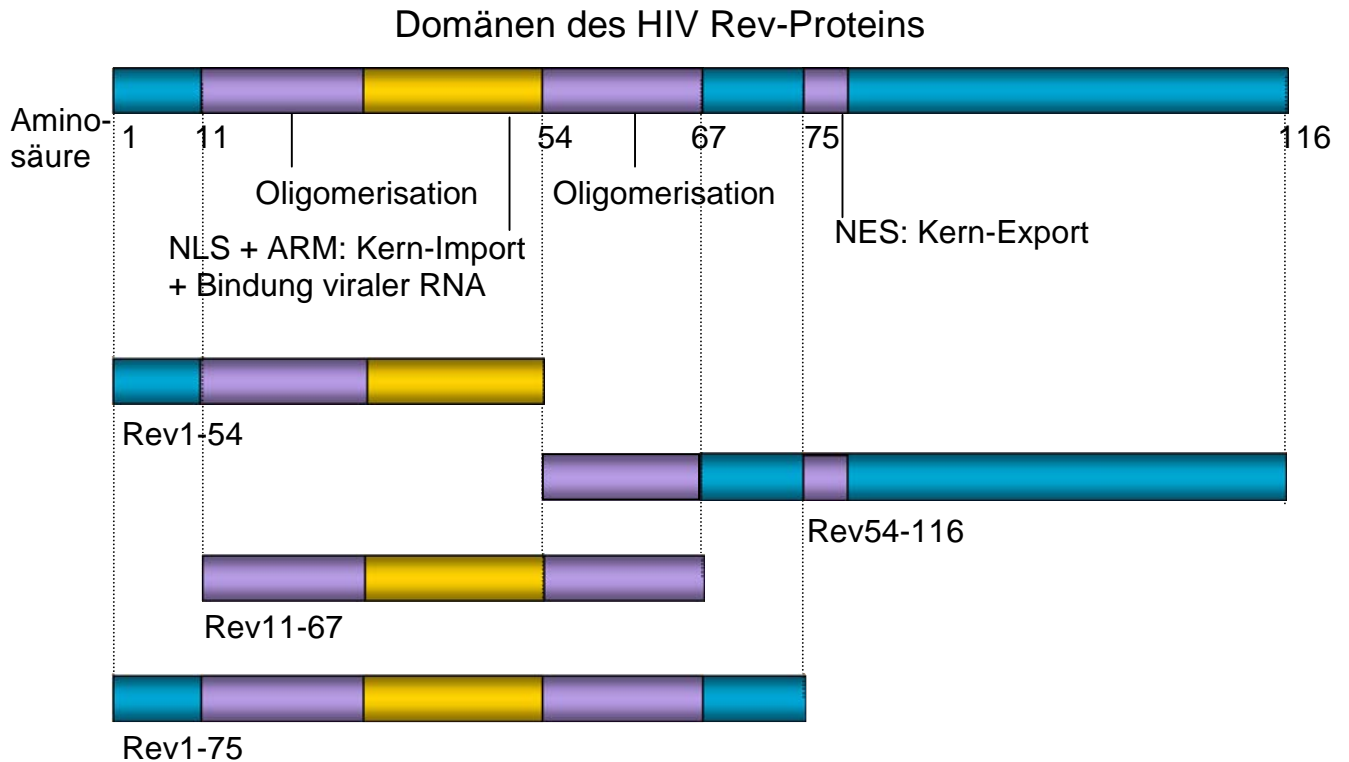


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Rev-Proteins und der verwendeten Rev-Fragmente.

Die oben beschriebenen Rev-Fragmente wurden in das Plasmid pBT kloniert und die Interaktionsstärken mit den pTRG-Plasmiden, die die zu testenden Faktoren enthielten, bestimmt. Dazu wurden wieder BMI-Zellen mit den entsprechenden pBT- und pTRG-Plasmiden co-transformiert und die Interaktionsstärken im β -Galactosidase-Assay ermittelt, siehe Abbildung 22.

Die Interaktionsstärke mit dem Rev-Protein voller Länge wurde jeweils auf 100 % gesetzt. In Abbildung 22 ist zu sehen, daß das Rev-Protein selbst weder mit dem N-terminalen Fragment Rev 1 - 54 noch dem C-terminalen Fragment Rev 54 - 116, die beide nicht die Oligomerisierungsdomäne enthalten, interagiert. Dasselbe gilt jeweils für die Interaktion dieser beiden Rev-Fragmente mit B1-1 bzw. B2-92. Negative Werte deuten hier auf Toxizität im bakteriellen System hin. Weder Rev noch die beiden neu gefundenen Rev-interagierenden Faktoren B1-1 und B2-92 interagieren also alleine mit einem der Motive NLS, ARM oder NES.

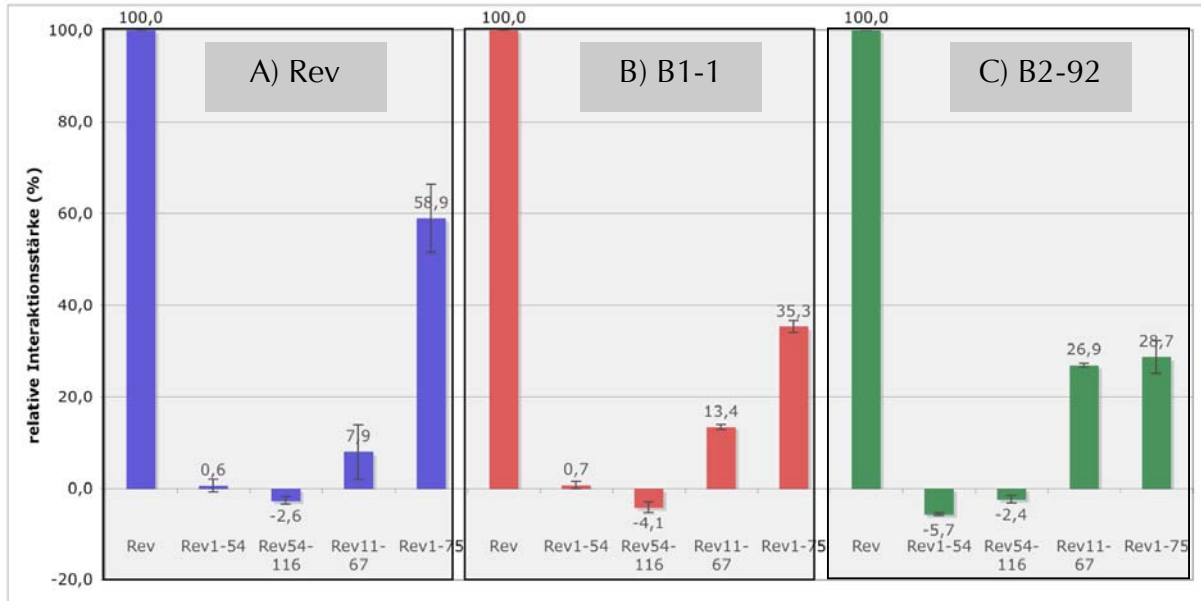


Abbildung 22: Interaktionsstärken von Rev und den beiden Faktoren B1-1 und B2-92 mit unterschiedlichen Bereichen in Rev. Die angegebenen Rev-Fragmente wurden in pBT kloniert und BMI-Zellen mit diesen Plasmiden und den Faktoren in pTRG wie angegeben co-transformiert. Die Interaktionsstärken wurden in drei unabhängigen Experimenten (A, B, C) im β -Galactosidase-Assay gemessen. Die Interaktionsstärke mit dem Rev-Protein voller Länge für die Ansätze A, B und C wurde auf jeweils 100 % gesetzt. A: Interaktion von Rev mit Rev-Fragmenten; B: Interaktion von B1-1 mit Rev-Fragmenten; C: Interaktion von B2-92 mit Rev-Fragmenten. Die angegebenen Werte resultieren aus 3 bis 9 unabhängigen Co-Transformationen.

Das Fragment Rev 11 - 67 stellt nach Thomas et al. (1998) die minimale Rev-Oligomerisierungsdomäne dar. Dieser Bereich bildet eine sog. Helix-Loop-Helix-Struktur aus, an deren Spitze (Loop) NLS und ARM liegen. Um zu testen, ob diese dreidimensionale Struktur des N-terminalen Bereichs bei der Interaktion eine Rolle spielt wurde das Fragment Rev 11 - 67 konstruiert. Das Fragment Rev 1 - 75 enthält die Oligomerisierungsdomäne mit den angrenzenden stabilisierenden Bereichen. Rev zeigt mit der Minimalsequenz der Oligomerisierungsdomänen Rev 11 - 67 eine schwache Interaktion, die deutlich gesteigert wird wenn die angrenzenden Bereiche im Fragment 1 - 75 hinzukommen. So beträgt die Interaktionsstärke von Rev 1 - 75 mit Rev ca. 59 % der Stärke der Rev-Rev-Interaktion. Das deutet darauf hin, daß zur vollen Interaktionsstärke bei der Rev-Oligomerisierung außer der Oligomerisierungsdomäne auch C-terminale Bereiche bzw. die Gesamtlänge des Rev-Proteins beitragen.

Ähnliche Befunde ergeben sich auch für die beiden neu identifizierten Rev-Interaktoren B1-1 und B2-92. Beide interagieren mit dem Rev-Fragment 11 - 67 aber jeweils stärker mit Rev 1 - 75, wobei sie auch mit diesem Fragment jeweils deutlich unter 100 % liegen. B2-92 zeigt mit Rev 11 - 67 eine moderate Interaktion (ca. 27 %), die sich mit Rev 1 - 75 kaum mehr steigern läßt (ca. 29 %). Das

deutet möglicherweise darauf hin, daß B2-92 schon mit dem Minimalmotiv der Oligomerisierungsdomäne interagiert – diese Interaktion wird aber durch andere Bereiche in Rev weiter gesteigert. B1-1 interagiert hingegen nicht so stark mit Rev 11 - 67 (ca. 13 %). Die Interaktion kann aber durch die angrenzenden Bereiche zur Oligomerisierungsdomäne deutlich gesteigert werden, wie die Interaktionsstärke mit Rev 1 - 75 zeigt (ca. 35 %). Auch hier scheint für die volle Interaktionsstärke neben der Oligomerisierungsdomäne die Gesamtlänge von Rev wichtig zu sein.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß beide neu identifizierten Rev-Interaktoren B1-1 und B2-92 in Bakterien stärker mit Rev interagieren als Rev mit sich selbst. Das Protein voller Länge zu B1-1 GST A4 interagiert im bakteriellen Zwei-Hybrid-System nicht mit Rev – VPS 28, das Protein voller Länge zu B2-92, dagegen schon. Beide Faktoren B1-1 und B2-92 zeigen moderate Interaktion mit den Bereichen von Rev, die an der Oligomerisierung beteiligt sind. Dabei müssen für volle Interaktionsstärke weitere Bereiche in Rev mit verantwortlich sein.

3.2.1.3 Charakterisierung der Rev-interagierenden Domänen in B1-1

Um festzustellen, welche Abschnitte des Proteins B1-1 (aa 42 - 222 aus GST A4) mit Rev interagieren, wurden jeweils 3 Bereiche aus diesem Protein gewählt und per PCR entsprechende pTRG-Plasmide konstruiert, die den gewünschten Bereich exprimierten. Dies waren die Bereiche (siehe Abbildung 23):

• GST A4 aa 42-81	N-terminale Hälfte von GST A4 ohne die aa 1-41
• GST A4 aa 42-112	Enthält zusätzlich zum obigen Fragment einen Bereich der C-terminalen globulären Hälfte, der auch wichtig für die Dimerisierung ist
• GST A4 aa 82-222	C-terminale Hälfte von GST A4
• B1-1 (GST A4 aa 42-222)	B1-1 voller Länge als Positivkontrolle der Interaktion mit Rev

Verwendete Fragmente des B1-1 Proteins

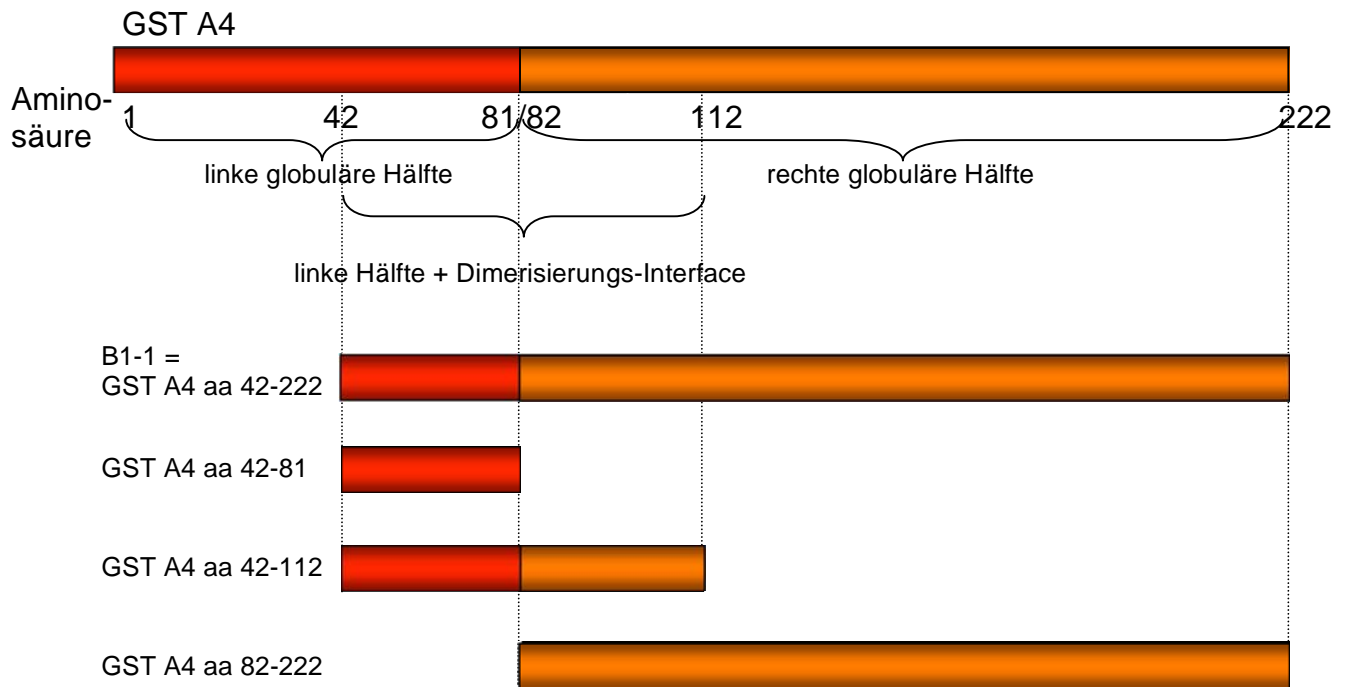


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Fragmente des B1-1 Proteins, die auf Interaktion mit Rev untersucht wurden, vgl. Abbildung 37.

Zur Struktur von GST A4 und Begründung der Wahl dieser Fragmente vgl. auch 4.4.1.2. Da nur B1-1 (entspricht GST A4 ohne die ersten 41 Aminosäuren), nicht aber GST A4 voller Länge mit Rev interagiert (siehe 3.2.1.1, 3.2.2.1 und 3.2.2.2), wurden die ersten 41 Aminosäuren von GST A4 bei der Konstruktion dieser drei Fragmente nicht berücksichtigt.

BMI Zellen wurden co-transformiert mit pBT-Rev und den entsprechenden pTRG-Plasmiden, von denen die oben beschriebenen B1-1 Fragmente exprimiert wurden. Die Interaktionsstärken wurden durch β -Galactosidase-Assay ermittelt.

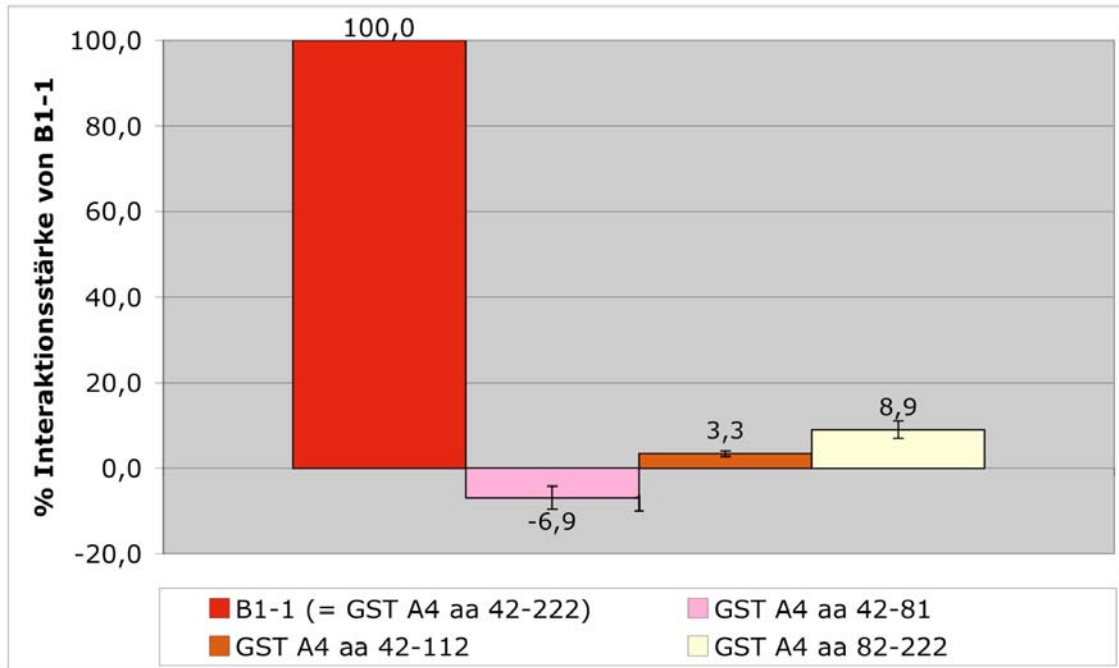


Abbildung 24: Interaktionsstärken von drei verschiedenen Fragmenten des Proteins B1-1 mit Rev. Die angegebenen B1-1 Fragmente wurden in pTRG kloniert und BMI-Zellen mit diesen Plasmiden und pBT-Rev co-transformiert. Die Interaktionsstärken wurden im β -Galactosidase-Assay gemessen und die Interaktionsstärke mit dem kompletten B1-1 Protein auf jeweils 100 % gesetzt. Die angegebenen Werte resultieren aus 3 unabhängigen Co-Transformationen.

Abbildung 24 zeigt, daß sich nur für das komplette B1-1 Protein (entspricht den Aminosäuren 42 - 222 aus GST A4) eine Interaktion mit Rev nachweisen läßt. Fragmente, die dem N- bzw. C-Terminus von B1-1 entsprechen, sowie ein Fragment, das zusätzlich zum N-terminalen Fragment einen Bereich aus der C-terminalen globulären Hälfte enthält, interagieren kaum mit Rev. Das deutet darauf hin, daß für die Interaktion zwischen Rev und B1-1 größere strukturell zusammenhängende Bereiche aus B1-1 wichtig sind, wobei aber die Aminosäuren 1-41 aus GST A4 diese Interaktion verhindern, siehe 3.2.1.1, 3.2.2.1 und 3.2.2.2.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß im bakteriellen Zwei-Hybrid-System weder die N-terminale noch die C-terminale Hälfte von B1-1 noch ein weiteres getestetes Fragment mit Rev interagieren, sondern nur das komplette B1-1 Protein (GST A4 Aminosäuren 42-222).

3.2.1.4 Charakterisierung der Rev-interagierenden Domänen in VPS 28

VPS 28, das zu B2-92 gehörende Protein voller Länge, wurde ebenfalls in 3 Bereiche unterteilt, und diese wurden jeweils auf Interaktion mit Rev getestet. Dabei handelt es sich um die Bereiche, siehe Abbildung 25:

- | | |
|----------------------------|--|
| • VPS 28 aa 2-123 | N-terminale Hälfte von VPS 28 |
| • VPS 28 aa 85-176 | mittlerer Bereich aus VPS 28 |
| • VPS 28 aa 124-221 | C-terminale Hälfte von VPS 28 |
| • B2-92 (VPS 28 aa 17-221) | B2-92 als Positivkontrolle der Interaktion mit Rev |
| • VPS 28 (aa 1-221) | weitere Kontrolle der Interaktion mit Rev |

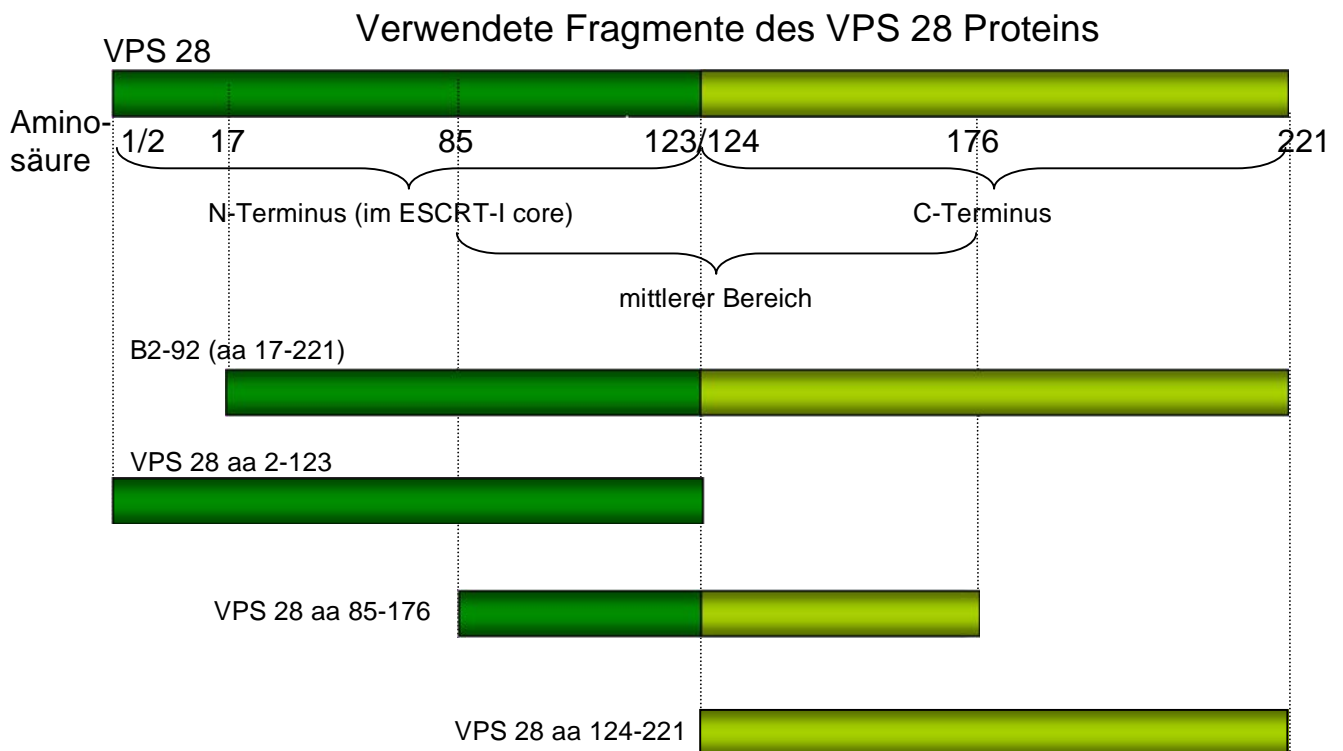


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Fragmente des VPS 28 Proteins, die auf Interaktion mit Rev untersucht wurden, vgl. Abbildung 55.

Die Kristall-Struktur von VPS 28 ist teilweise bekannt. Die Tertiär- und Sekundärstruktur von VPS 28 bildete die Grundlage für die Wahl der Fragmente, vgl. auch 4.4.2.2. Da sowohl das VPS 28 Protein voller Länge als auch das ursprünglich im cDNA-Library-Screening entdeckte Fragment B2-92 (den Aminosäuren 17 bis 221

aus VPS 28 entsprechend) mit Rev interagieren (siehe 3.2.1.1 – Abbildung 20 –, 3.2.2.1 – Abbildung 28, G und I – und 3.2.2.2 – Abbildung 30 B, 5 und 7) wurden beide Proteine als Kontrolle für die Interaktion mit Rev berücksichtigt. Das Fragment der N-terminalen Hälfte erstreckt sich daher auch auf den ganzen N-terminalen Bereich.

Zur Analyse der Interaktion von Rev mit den verschiedenen VPS 28 Fragmenten wurden BMI Zellen mit pBT-Rev und den entsprechenden pTRG-Plasmiden, von denen die oben beschriebenen VPS 28 Fragmente exprimiert wurden, co-transformiert. Die Interaktionsstärken wurden durch β -Galactosidase-Assay ermittelt.

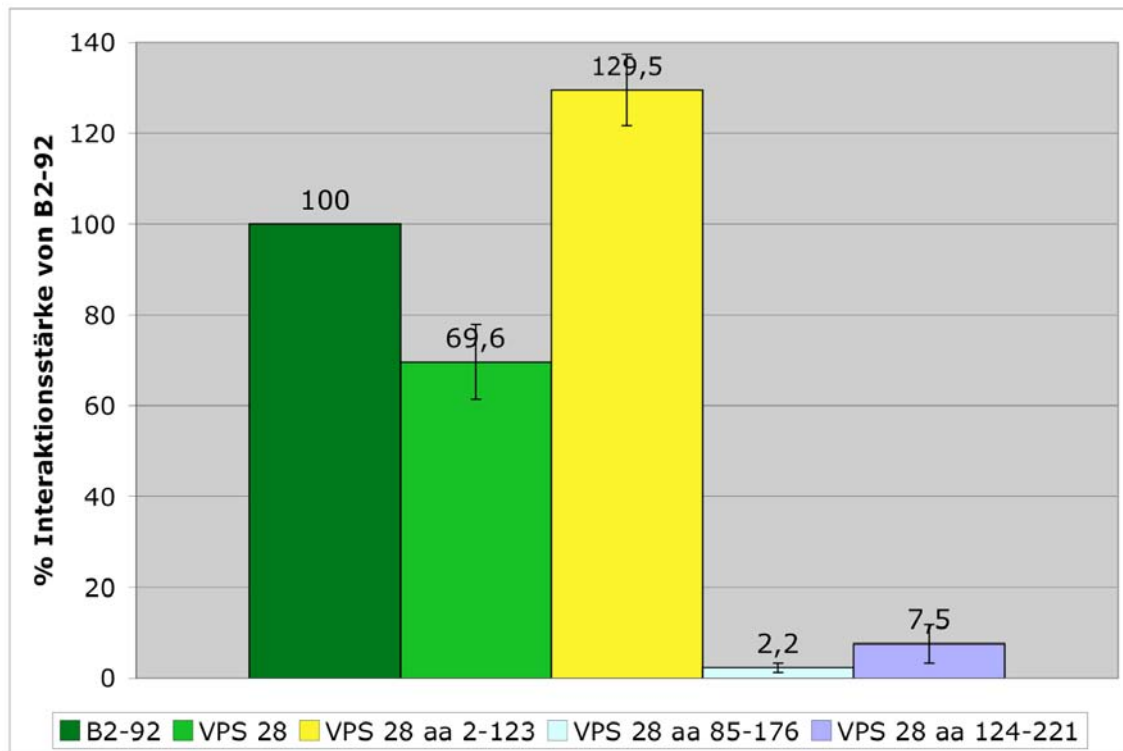


Abbildung 26: Interaktionsstärken von verschiedenen Fragmenten des Proteins VPS 28 mit Rev. Die angegebenen VPS 28 Fragmente wurden in pTRG kloniert und BMI-Zellen mit diesen Plasmiden und pBT-Rev co-transformiert. Die Interaktionsstärken wurden im β -Galactosidase-Assay gemessen und die Interaktionsstärke mit B2-92 auf jeweils 100 % gesetzt. Die angegebenen Werte resultieren aus je 3 unabhängigen Co-Transformationen.

Aus Abbildung 26 ist ersichtlich, daß das VPS 28 Protein voller Länge mit Rev interagiert, allerdings nur knapp 70 % der Interaktionsstärke von B2-92 (Aminosäuren 17-221 aus VPS 28) erreicht. Dieses Resultat stimmt mit früher erhaltenen Ergebnissen überein, siehe 3.2.1.1. Die Fragmente des mittleren Bereichs und des

C-terminalen Bereichs interagieren nicht deutlich mit Rev. Jedoch zeigt das N-terminale Fragment VPS 28 aa 2 - 123 eine Interaktion mit Rev, deren Stärke sogar mit ca. 130 % über die Stärke der Rev - B2-92 Interaktion hinausgeht. Damit läßt sich der mit Rev interagierende Bereich von VPS 28 auf den N-Terminus aa 2 - 123 eingrenzen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems der N-Terminus von VPS 28 Aminosäuren 2 bis 123 als Rev-interagierende Domäne eingegrenzt werden konnte. Die Interaktionsstärke dieses N-terminalen Bereichs von VPS 28 mit Rev ist deutlich stärker als die Interaktionsstärken des gesamten (VPS 28) oder N-terminal verkürzten (B2-92 bzw. C-terminales Fragment) Proteins.

3.2.1.5 Überprüfung der Fähigkeit zur Dimer-Bildung von B1-1

Es ist bekannt, daß GST A4 in eukaryontischen Zellen Dimere bilden kann, siehe 5.1.9. So stellt sich die Frage, ob auch B1-1 als N-terminal verkürztes Fragment von GST A4 (Aminosäuren 42 bis 222) in der Lage ist, Dimere zu bilden. Einige für die Dimerbildung wichtige Aminosäuren fehlen B1-1, siehe 4.4.1.3, vgl. 5.1.9. Hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Einsatzes von B1-1 (siehe 4.6) ist daher die Frage, ob B1-1 mit GST A4, das z.B. endogen in der Zelle vorliegt, Dimere bilden kann, von besonderem Interesse. Daher wurde mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems die Interaktion von B1-1 mit GST A4 untersucht. Die Interaktionsstärken wurden mittels β -Galactosidase-Assay quantifiziert und mit den Interaktionsstärken der Rev - B1-1 Interaktion und der GST A4 - GST A4 Interaktion (Dimerisierung) verglichen.

Dazu wurde das Plasmid pBT-GST A4 konstruiert und zusammen mit den in Abbildung 27 angegebenen pTRG-Plasmiden in BMI Zellen co-transformiert.

Abbildung 27 zeigt, daß die in der Literatur beschriebene Interaktion von GST A4 mit sich selbst (Dimerisierung) im bakteriellen Zwei-Hybrid-System nachweisbar ist. Allerdings beträgt die Interaktionsstärke der Bindung von GST A4 an ein weiteres Molekül GST A4 nur knapp 19 % der Interaktionsstärke zwischen B1-1 und Rev. Die Interaktionsstärke zwischen B1-1 und GST A4 ist mit knapp 10 % der B1-1 - Rev Interaktionsstärke noch deutlich geringer.

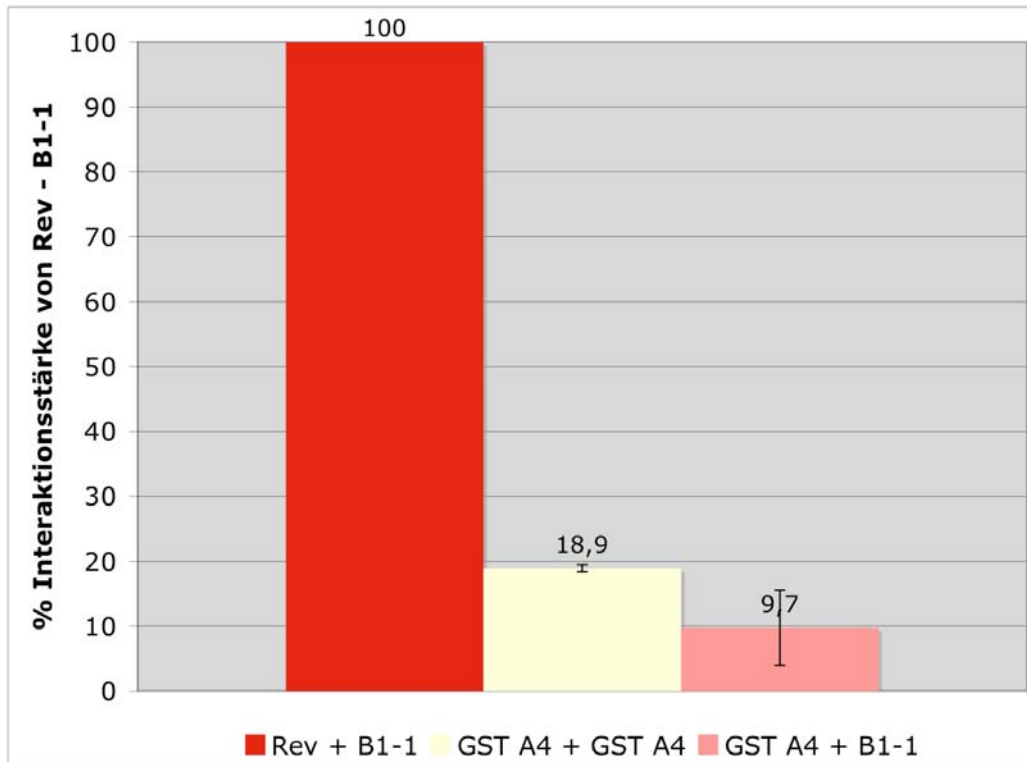


Abbildung 27: Untersuchung der Fähigkeit zur Dimer-Bildung von B1-1. BMI Zellen wurden mit den angegebenen Plasmid-Kombinationen (jeweils als pBT- und pTRG-Plasmid vorliegend) co-transformiert und die Interaktionsstärken im β -Galactosidase-Assay ermittelt. Die Stärke der Rev - B1-1 Interaktion wurde auf 100 % gesetzt, und die übrigen Werte wurden darauf bezogen. Die angegebenen Werte resultieren aus 3 unabhängigen Co-Transformationen.

Es kann daher gefolgert werden, daß die bei B1-1 fehlenden 41 N-terminalen Aminosäuren tatsächlich einige für die Dimerisierung wichtigen Bereiche enthalten, da die Fähigkeit zur Heterodimer-Bildung mit GST A4 deutlich geringer ausgeprägt ist als die der Homodimer-Bildung zwischen GST A4 und GST A4. Die Interaktion von Rev mit B1-1 ist im bakteriellen System ungefähr 10fach stärker als die Interaktion von GST A4 mit B1-1. Falls im humanen System ähnliche Interaktionsstärken vorherrschen, kann angenommen werden, daß humane Zellen, in die B1-1 therapeutisch eingebracht würde bzw. die nach therapeutischer Behandlung selbst B1-1 exprimieren, kaum in der normalen Funktion des endogenen GST A4 Dimers beeinträchtigt wären, siehe 4.4.1.3.

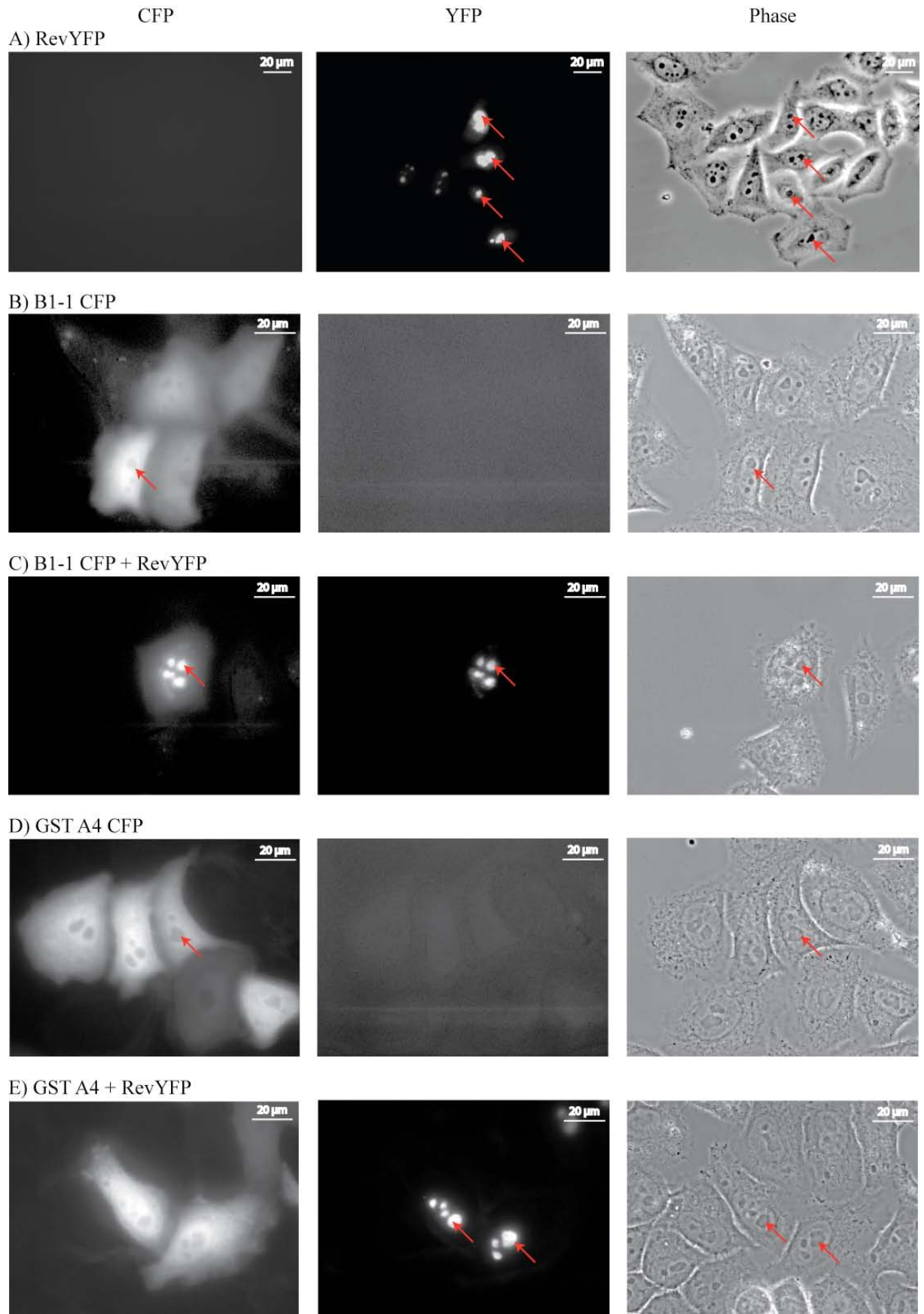
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems die Dimerbildung von GST A4 gezeigt werden kann. Die Interaktion von B1-1 mit Rev ist ca. 10fach stärker als die mit GST A4. Die Interaktion zwischen zwei Molekülen GST A4 (Homodimer) ist ca. doppelt so stark wie die von B1-1 mit GST A4 (Heterodimer).

3.2.2 Charakterisierung in humanen Zellen

Die Interaktion der neu identifizierten Faktoren B1-1 und B2-92 mit Rev wurde wie oben beschrieben im bakteriellen System verifiziert und näher charakterisiert. Dabei wurden mit dem bakteriellen Zwei-Hybrid-System genetische Methoden angewendet. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Interaktion der neuen Faktoren mit Rev in humanen Zellen. Zugleich wurde damit die Interaktion dieser Faktoren mit Rev mit unabhängigen Methoden (*in cyto* Mikroskopie und biochemische Methoden) bestätigt.

3.2.2.1 Co-Lokalisation der neu identifizierten Interaktoren mit Rev

Das Rev-Protein besitzt Signalsequenzen, die den Transport in den Zellkern (NLS) und Export aus dem Zellkern (NES) vermitteln, siehe 1.2.1. Die Lokalisierung des Rev-Proteins in der Zelle wird durch das Zusammenspiel dieser beiden Signale bestimmt. In HeLa-Zellen befindet sich das Rev-Protein zum überwiegenden Anteil in den Nukleoli im Zellkern. Die beiden neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren B1-1 und B2-92 bzw. deren korrespondierende Proteine voller Länge besitzen keine in der Literatur beschriebenen Lokalisations-Signalsequenzen und liegen in der gesamten Zelle vor, wobei aber die Nukleoli in der Regel ausgespart sind, siehe Abbildung 28. Falls diese Faktoren aber mit Rev interagieren, ist es wahrscheinlich, daß in Gegenwart von Rev eine Umordnung der Lokalisation stattfindet. Daher wurde die Lokalisation der Faktoren B1-1 und B2-92 jeweils mit und ohne Rev in HeLa-Zellen untersucht. Dazu wurden Plasmide konstruiert, mit deren Hilfe die Faktoren B1-1 bzw. B2-92 bzw. deren korrespondierende Proteine voller Länge als Fusionsproteine mit dem cyanfluoreszierenden Protein (CFP) exprimiert werden können (pC-B1-1-CFP, pC-B2-92-CFP, pC-GST A4-CFP bzw. pC-VPS 28-CFP), siehe 2.1.8. Rev wurde vom Plasmid pC-Rev-YFP als Fusionsprotein mit dem gelb-fluoreszierenden Protein (YFP) exprimiert. Voraussetzung für eine erfolgreiche Analyse der gleichzeitigen Lokalisation von Rev und Faktoren ist, daß die CFP- und YFP-Kanäle mikroskopisch mit entsprechenden Filtern getrennt werden können und nicht ineinander überstrahlen. Dies wird im folgenden gezeigt. Außerdem wurde bei allen Aufnahmen die Focus-Ebene zwischen YFP- und CFP-Kanal nicht verändert, siehe 2.2.4.



Fortsetzung nächste Seite

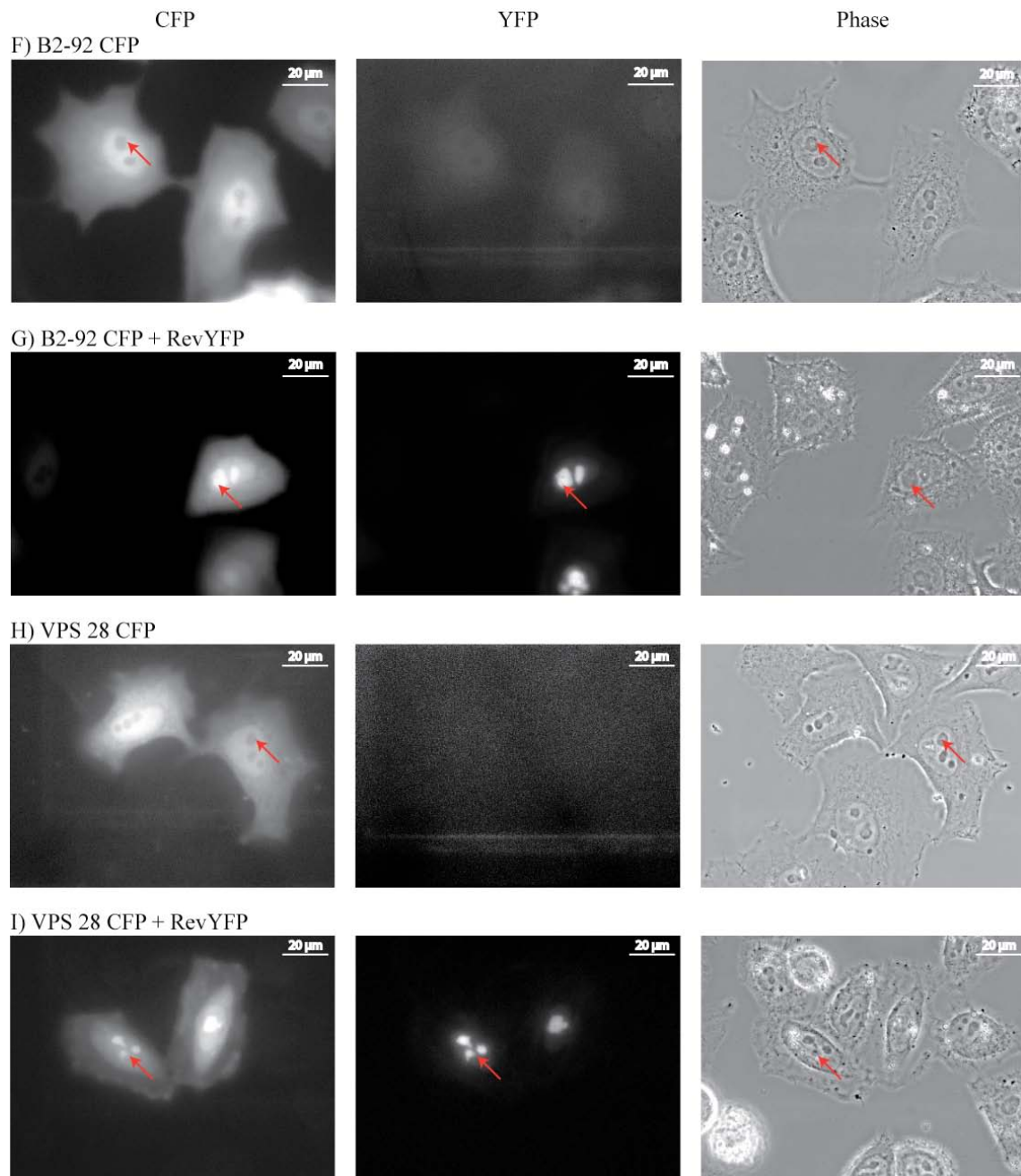


Abbildung 28: Untersuchung der Co-Lokalisation von Rev mit den neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Rev als YFP-Fusion bzw. die auf Co-Lokalisation zu testenden Faktoren jeweils als CFP-Fusion wie angegeben transient transfiziert. Für einen Bildausschnitt wurden jeweils Mikroskop-Aufnahmen der Kanäle CFP, YFP und Phase angefertigt und gegenübergestellt.

Die in Abbildung 28 gezeigten Mikroskop-Aufnahmen sind jeweils repräsentativ. Wie Tabelle 6 zeigt, wurde jeder Ansatz mehrmals wiederholt, die Lokalisationen der fluoreszierenden Proteine jeweils festgehalten und bei den Ansätzen C, E, G und I der Anteil der Zellen, die jeweils Co-Lokalisation mit Rev zeigten, berechnet.

Tabelle 6: Quantifizierung der Untersuchung der Co-Lokalisation mit den neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren. (Siehe Abbildung 28).

(1)	exprimierte fluoreszierende Proteine	Anzahl untersuchter Zellen	typische Lokalisation hinsichtlich der Nukleoli	Anzahl der Zellen, die diese Lokalisation zeigten	Co-Lokalisation mit Rev (%)
A	RevYFP	25	deutliche Anfärbung der Nukleoli	25	—
B	B1-1 CFP	76	Nukleoli ausgespart	76	—
C	B1-1 CFP + RevYFP	74	deutliche Anfärbung der Nukleoli	71	71 (97,3 %)
D	GST A4 CFP	16	Nukleoli ausgespart	16	—
E	GST A4 CFP+ RevYFP	42	Nukleoli ausgespart	39	3 (7,1 %)
F	B2-92 CFP	16	Nukleoli ausgespart	16	—
G	B2-92 CFP+ RevYFP	25	deutliche Anfärbung der Nukleoli	25	25 (100 %)
H	VPS 28 CFP	39	Nukleoli ausgespart	39	—
I	VPS 28 CFP + RevYFP	37	deutliche Anfärbung der Nukleoli	37	37 (100 %)

(1) Nummer in Abbildung 28

In Abbildung 28 A wurden HeLa-Zellen nur mit pC-Rev-YFP transfiziert, und es ist zu sehen, daß kein Signal im CFP-Kanal detektierbar ist. Die Belichtungszeit wurde hier manuell auf einen Wert gesetzt, der die Belichtungszeiten der Aufnahmen in Abbildung 28 B bis I weit überschreitet. Ein Überstrahlen des YFP-Signals in den CFP-Kanal kann daher ausgeschlossen werden. Abbildung 28 A (YFP Kanal) zeigt die für HeLa-Zellen typische Lokalisierung von Rev hauptsächlich in den Nukleoli. Alle auf Rev-Interaktion zu testende Faktoren (B1-1, GST A4, B2-92 und VPS 28) zeigen ohne Rev eine Lokalisation in der gesamten Zelle,

wobei die Nukleoli meist ausgespart bleiben – siehe Pfeile in Abbildung 28 B, D, F und H. Auch hier ist in keinem Fall ein Überstrahlen des CFP-Signals in den YFP-Kanal zu beobachten, was bestätigt, daß beide Kanäle getrennt sind. Wenn B1-1, B2-92 oder VPS 28 zusammen mit Rev gleichzeitig in HeLa-Zellen exprimiert werden, zeigt sich eine deutliche Änderung der Lokalisation, siehe Abbildung 28 C, G und I. Rev bewirkt offensichtlich eine Akkumulation dieser Proteine in den Nukleoli (siehe Pfeile in den Abbildungen), die am stärksten bei B1-1 ausgeprägt ist. Das steht in deutlichem Gegensatz zur Lokalisation dieser Faktoren ohne Rev, bei denen die Nukleoli ausgespart sind, siehe oben. Die Lokalisation von Rev selbst ist nicht geändert.

Lediglich GST A4 zeigt keine Akkumulation in den Nukleoli in Gegenwart von Rev und ist damit der einzige Faktor, bei dem keine Co-Lokalisation beobachtet werden kann.

B1-1 zeigt in sehr seltenen Fällen keine Co-Lokalisation mit Rev, siehe Tabelle 6, nämlich in ca. 2,7 % der Fälle (bzw. 3 von 74 untersuchten Zellen). Dies ist möglicherweise auf seltene Faltungs-Varianten/-Fehler von B1-1 zurückzuführen, siehe 4.4.1.1. In sämtlichen anderen Untersuchungen zur Interaktion von B1-1 mit Rev konnte eine Interaktion stets eindeutig gezeigt werden (siehe Co-Immunopräzipitation, 3.2.2.2, und Ergebnisse im bakteriellen Zwei-Hybrid-System 3.2.1.1). Ähnlich zeigt GST A4 in seltenen Fällen, nämlich 7,1 % (bzw. 3 von 42 untersuchten Zellen) eine Co-Lokalisation mit Rev in den Nukleoli. Auch hier sind vermutlich seltene Faltungs-Varianten/-Fehler von GST A4 verantwortlich, siehe 4.4.1.1.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Co-Lokalisation von Rev mit B1-1, B2-92 und VPS 28 in den Nukleoli zu beobachten ist. Ohne Rev sind diese Proteine sowie GST A4 in der gesamten Zelle lokalisiert, wobei die Nukleoli meist ausgespart bleiben. GST A4 läßt hingegen keine Co-Lokalisation mit Rev erkennen.

3.2.2.2 Co-Immunopräzipitation der neu identifizierten Interaktoren mit Rev

Die im bakteriellen Zwei-Hybrid-System neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren B1-1 und B2-92, sowie deren zugehörigen Proteine voller Länge GST A4 bzw. VPS 28 wurden im folgenden mit Hilfe der Technik der Co-Immunopräzipitation in humanen Zellen auf Interaktion mit Rev untersucht. Dies stellt

neben der Co-Lokalisation (siehe 3.2.2.1) einen weiteren Test auf Interaktion in humanen Zellen dar. Die in diesem Abschnitt beschriebene Co-Immuno-präzipitation ist ein biochemischer Ansatz und somit methodisch unabhängig vom genetischen Ansatz des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems (siehe 3.2.1) und von den mikroskopischen Analysen der Co-Lokalisation (siehe 3.2.2.1).

Das Prinzip der hier verwendeten Co-Immunopräzipitation ist schematisch in Abbildung 29 dargestellt.

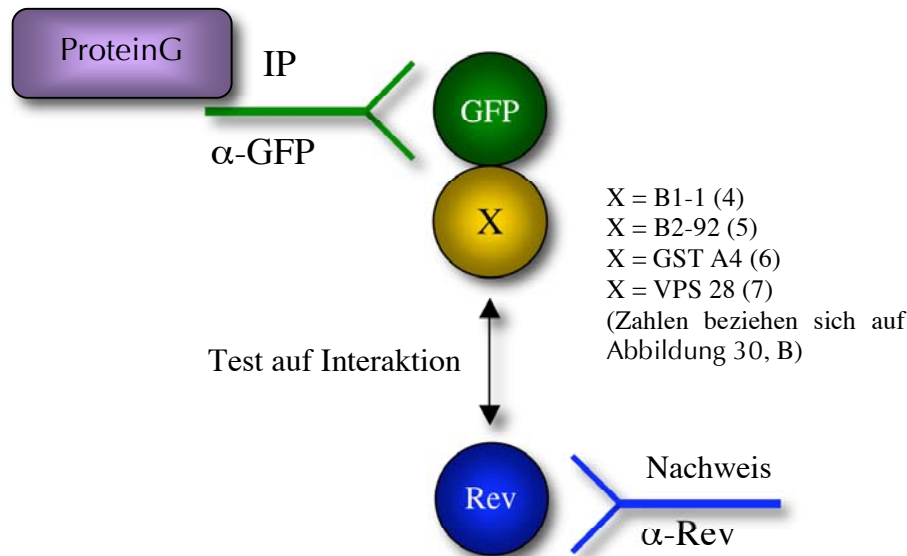


Abbildung 29: Schematische Darstellung des Ablaufs der Co-Immunopräzipitation. Der auf Interaktion mit Rev zu testende Faktor X lag als Fusionsprotein mit GFP vor und wurde aus Zellen, die diesen Faktor und Rev exprimierten, durch einen α -GFP Antikörper und ProteinG gefällt. Falls X mit Rev interagiert, wurde dabei Rev mit gefällt und konnte mit einem α -Rev Antikörper nachgewiesen werden. Nicht gebundene Proteine wurden zuvor durch Waschen entfernt.

Für die Co-Immunopräzipitation (siehe 2.2.6) wurden HeLa-Zellen mit Paaren von Expressionsplasmiden, die jeweils für die auf Interaktion zu untersuchenden Proteine codierten, transfiziert. Da die Interaktion verschiedener Faktoren mit Rev untersucht wurde, enthielt jeder Ansatz Rev-his vom Plasmid pC-Rev-his. Der auf Rev-Interaktion zu testende Faktor wurde als pC-Plasmid mit pC-Rev-his co-transfiziert, siehe Abbildung 30. Die Immunopräzipitation erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper aus Kaninchen. Daher wurden sämtliche auf Rev-Interaktion zu testende Faktoren (außer eine Negativkontrolle) als GFP-Fusionsprotein eingesetzt. So war es auch möglich, die Proteinexpression mikroskopisch zu verfolgen und die Zellen zum richtigen Zeitpunkt zu ernten und aufzuschließen (nach 24 bzw. 48 Stunden). Vom GFP-Antikörper gebundene Proteine und der Antikörper selbst wurden an ProteinG-Sepharose gebunden und pelletiert. Dieses Pellet wurde

insgesamt 5 mal gründlich gewaschen (durch Vortexen mit Puffer und erneutem Pelletieren), um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Daraus resultierte die Fraktion der Immunopräzipitation, die das auf Rev-Interaktion zu testende Protein als GFP-Fusion enthielt und je nach Interaktion Rev aufwies oder nicht. Es wurden Westernblots aller Ansätze angefertigt, bei denen jeweils die Fraktion „L“ vor Zugabe des GFP-Antikörpers (enthält alle Proteine), die letzte Wasch-Fraktion „W“ und die Fraktion der Immunopräzipitation „IP“ aufgetragen sind, siehe Abbildung 30. Im Westernblot erfolgte zunächst die Detektion von Rev mit einem anti-Rev-Antikörper aus Ratte, siehe Abbildung 30 A-I und B-I; anschließend wurden die Membranen gestrippt, und es erfolgte die Detektion von GFP mit einem anti-GFP-Antikörper aus Maus, siehe Abbildung 30 A-II und B-II.

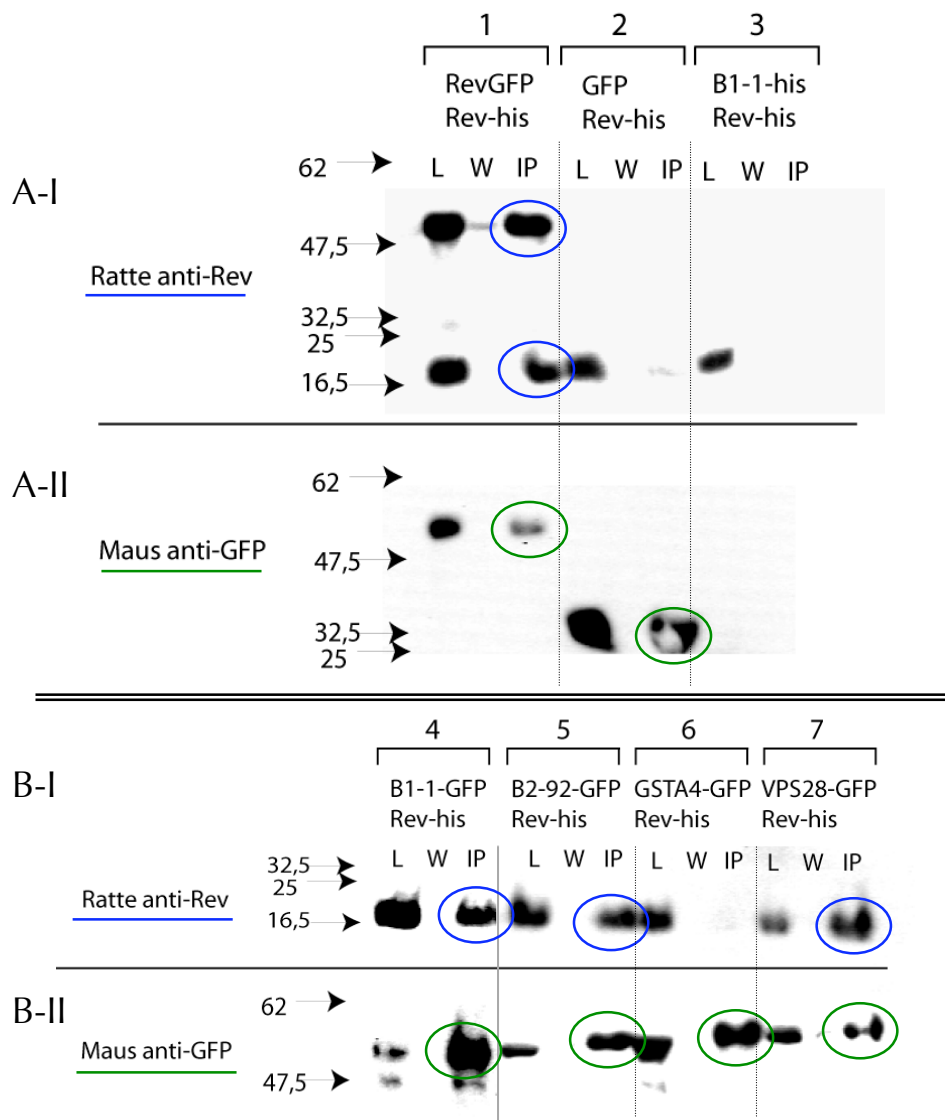


Abbildung 30: Westernblot der Co-Immunopräzipitation von Rev und den neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden wie angegeben transient transfiziert und, nachdem die Expression mikroskopisch sichtbar war (GFP-Fusionen), geerntet (repräsentiert jeweils durch die Fraktion „L“). Die Immunopräzipitation erfolgte mit einem

anti-GFP-Antikörper aus Kaninchen und ProteinG-Sepharose. Das Präzipitat wurde mehrmals gewaschen und die letzte Waschfraktion auf den Westernblot jeweils als „W“ aufgetragen. Außerdem wurde auf den Westernblot die Fraktion der Immunopräzipitation jeweils als „IP“ aufgetragen. Gezeigt sind hier die Westernblots aller Ansätze jeweils mit den Fraktionen „L“, „W“ und „IP“. Die Detektion von Rev (A-I und B-I) erfolgte mit einem anti-Rev-Antikörper aus Ratte; die Westernblots wurden anschließend gestrippt und einer Detektion von GFP mit einem anti-GFP-Antikörper aus Maus unterzogen (A-II und B-II). **A:** zeigt die Kontrollen zur Co-Immunopräzipitation (siehe Text); **B:** zeigt die Untersuchung der Co-Immunopräzipitation von Rev mit den neu identifizierten Faktoren.

In Abbildung 30 A sind die Kontrollen zur Co-Immunopräzipitation dargestellt. Ansatz 1 zeigt die Rev-Rev-Interaktion und dient als Positivkontrolle. Auf diesen Ansatz wurde das Protokoll der Co-Immunopräzipitation optimiert. Fraktionen „L“ und „IP“ in Ansatz 1 zeigen im anti-Rev Westernblot je zwei Banden, die RevGFP und Rev-his entsprechen und in Abbildung 30, A-I durch 2 blaue Kreise markiert sind. Die RevGFP-Bande ist ebenfalls in der „IP“-Fraktion im anti-GFP-Westernblot zu sehen und in Abbildung 30, A-II durch einen grünen Kreis markiert. Das heißt, RevGFP wurde gefällt und hat Rev-his gebunden. Ansatz 2 zeigt die Negativkontrolle, bei der zwar GFP gefällt wurde – siehe GFP-Bande bei ca. 29 kD in „IP“ im anti-GFP-Westernblot, Abbildung 30, A-II, grüner Kreis – aber Rev in der „IP“-Fraktion nicht nachweisbar ist, da Rev nicht mit GFP alleine interagiert. Diese Kontrollen zeigen, daß eine Co-Immunopräzipitation, also eine Rev-Bande in der „IP“-Fraktion, nur zu beobachten ist, wenn Rev einen Interaktionspartner als GFP-Fusion bindet.

Ansatz 3 stellt eine weitere Negativkontrolle dar. Das hier eingesetzte Protein B1-1 kann zwar mit Rev interagieren – siehe Abbildung 30, B-I, Ansatz 4 und obige Ergebnisse – wird aber durch die Immunopräzipitation mittels α -GFP Antikörper nicht gefällt, da es nicht als GFP-Fusionsprotein vorliegt. Demzufolge ist auch Rev in der „IP“-Fraktion nicht nachweisbar. Dieses Kontrollexperiment demonstriert, daß eine Immunopräzipitation nur spezifisch von GFP-Fusionsproteinen stattfinden kann.

Abbildung 30 B zeigt die Untersuchung der Co-Immunopräzipitation von Rev mit den neu identifizierten Faktoren. Alle Faktoren wurden als GFP-Fusionsproteine exprimiert und vom anti-GFP-Antikörper gefällt (siehe Banden jeweils in „L“ und „IP“ im anti-GFP-Westernblot, Abbildung 30 B-II, markiert durch grüne Kreise). Die dabei zu erwartenden Proteingrößen sind: 48 kD für B1-1-GFP, 51 kD für B2-92-GFP, 53 kD für GST A4-GFP und 53 kD für VPS28-GFP. Die Faktoren B1-1, B2-92 und VPS 28 zeigen Co-Immunopräzipitation mit Rev (siehe Banden

jeweils in der „IP“-Fraktion in Ansätzen 4, 5 und 7 im anti-Rev-Westernblot, Abbildung 30 B-I, markiert durch blaue Kreise). GST A4 hingegen zeigt keine Interaktion mit Rev, siehe Abwesenheit einer Bande in der „IP“-Fraktion im Ansatz 6 im anti-Rev-Westernblot.

Die Ansätze dieses Experiments wurden mindestens zweimal mit jeweils den gleichen Ergebnissen durchgeführt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Rev zusammen mit B1-1, B2-92 und VPS 28 co-immunopräzipitiert. GST A4 hingegen ist nicht in der Lage, Rev zu co-präzipitieren.

3.2.2.3 Untersuchung der Zytotoxizität der neu identifizierten Faktoren in humanen Zellen

Eine essentielle Voraussetzung für einen möglichen zukünftigen therapeutischen Einsatz der in dieser Arbeit neu identifizierten Rev interagierenden Proteine B1-1 und B2-92 oder Teilen davon ist die Abwesenheit von toxischen Effekten dieser Proteine auf humane Zellen. Daher wurde eine Zytotoxizitäts-Untersuchung mit B1-1 und B2-92 durchgeführt. Es gibt eine Reihe von Toxizitäts-Tests, die verschiedene Fragestellungen beantworten können, so daß für eine umfassende Toxizitäts-Untersuchung sicher mehrere Tests durchgeführt werden müssen – siehe 4.4.3. Daher ist es sinnvoll, als ersten Toxizitäts-Test zu untersuchen, ob eine Überexpression von B1-1 oder B2-92 in HeLa-Zellen sich zellschädigend auswirkt. So wurde als Zytotoxizitäts-Test der Ansatz zur Messung freigesetzter Lactat-Dehydrogenase (LDH release Assay) gewählt (siehe 4.4.3 bzw. 2.2.7) und dazu der CytoTox-ONE Kit von Promega verwendet. Bei diesem Test wird die Freisetzung des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus Zellen gemessen, deren Zellwand durch toxische Einflüsse geschädigt wurde. Die freigesetzte LDH katalysiert eine Farbreaktion, was nach Zugabe eines Farbstoffs photometrisch gemessen werden kann.

HeLa-Zellen wurden zu $5 \cdot 10^3$ Zellen pro Loch in eine 96-Loch-Platte ausgesät und am folgenden Tag mit unterschiedlichen Mengen an Expressionsplasmid für die Faktoren B1-1 und B2-92 mittels FuGENE transfiziert. Es wurden dabei die Plasmide pC-B1-1-CFP und pC-B2-92-CFP mit jeweils 10 ng, 50 ng bzw. 100 ng DNA pro Loch eingesetzt. Die Faktoren B1-1 und B2-92 wurden jeweils alleine oder in Kombination mit Rev eingesetzt, wobei dann das Expressionsplasmid pC-Rev-his in jeweils gleicher Menge wie der Faktor eingesetzt wurde. Von allen

Ansätzen wurden Triplikate angefertigt. Das Experiment wurde mehrfach wiederholt und die Toxizitätsmessung entweder 24 oder 48 Stunden nach der Transfektion wie in 2.2.7 beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden vor der Toxizitätsmessung einige Zellen der 96-Loch-Platte mit Lysis-Substrat, das mit dem Kit mitgeliefert wurde, behandelt. Der Mittelwert der auf diese Weise erhaltenen Lysis-Kontrolle definierte 100 % Toxizität. Weiterhin wurden einige Zellen der 96-Loch-Platte nur mit FuGENE ohne DNA versetzt. Der Mittelwert dieser Kontrolle für die durch das Transfektionsreagenz FuGENE alleine verursachte Toxizität wurde den Ergebnissen der Faktoren B1-1 und B2-92 sowie Rev gegenübergestellt. Die Toxizität wurde jeweils als Anteil der Toxizität der 100 % Lysis-Kontrolle berechnet.

Tabelle 7: Relative zytotoxische Wirkung der Faktoren B1-1 und B2-92 und des Rev-Proteins auf HeLa Zellen, gemessen mit dem CytoTox-ONE Assay (Promega). HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an Expressionsplasmid für B1-1 (pC-B1-1-CFP) und B2-92 (pC-B2-92-CFP) transfiziert, jeweils alleine oder in Kombination mit gleichen Menge an Rev-Expressionsplasmid (pC-Rev-his). Zusätzlich wurde die Toxizität von Rev alleine untersucht (vorletzte Zeile). Die Toxizitätsmessung wurde nach 24 bzw. 48 Stunden durchgeführt. Die Werte wurden auf die Lysis-Kontrolle (100 % Toxizität) bezogen, siehe Text. Dargestellt ist außerdem die durch das Transfektionsreagenz FuGENE alleine verursachte Toxizität (letzte Zeile). Die angegebenen Werte resultieren jeweils aus 6 bis 9 individuellen Messungen. MW = Mittelwert; STW = Standardabweichung

	% Zytotoxizität (von 100 % der Lysis-Kontrolle)											
	10 ng				50 ng				100 ng			
	24 h		48 h		24 h		48 h		24 h		48 h	
	MW	STW	MW	STW	MW	STW	MW	STW	MW	STW	MW	STW
B1-1												
ohne Rev	2,2	1,9	2,6	1,2	3,2	1,6	4,5	3,4	2,1	0,6	5,2	2,6
mit Rev	1,9	0,9	0,5	0,4	2,9	0,8	3,2	2,0	3,3	1,2	3,0	1,4
B2-92												
ohne Rev	4,1	1,2	2,5	0,6	2,8	1,3	3,2	1,7	2,5	1,8	3,8	1,7
mit Rev	3,0	0,5	2,4	0,7	3,0	1,0	3,2	1,0	3,3	1,8	3,6	1,6
Rev	2,1	0,9	0,4	0,4	2,5	0,7	1,2	0,6	3,4	1,0	2,9	1,5
FuGENE	3,7	1,0	5,7	3,3	3,7	1,0	5,7	3,3	3,7	1,0	5,7	3,3

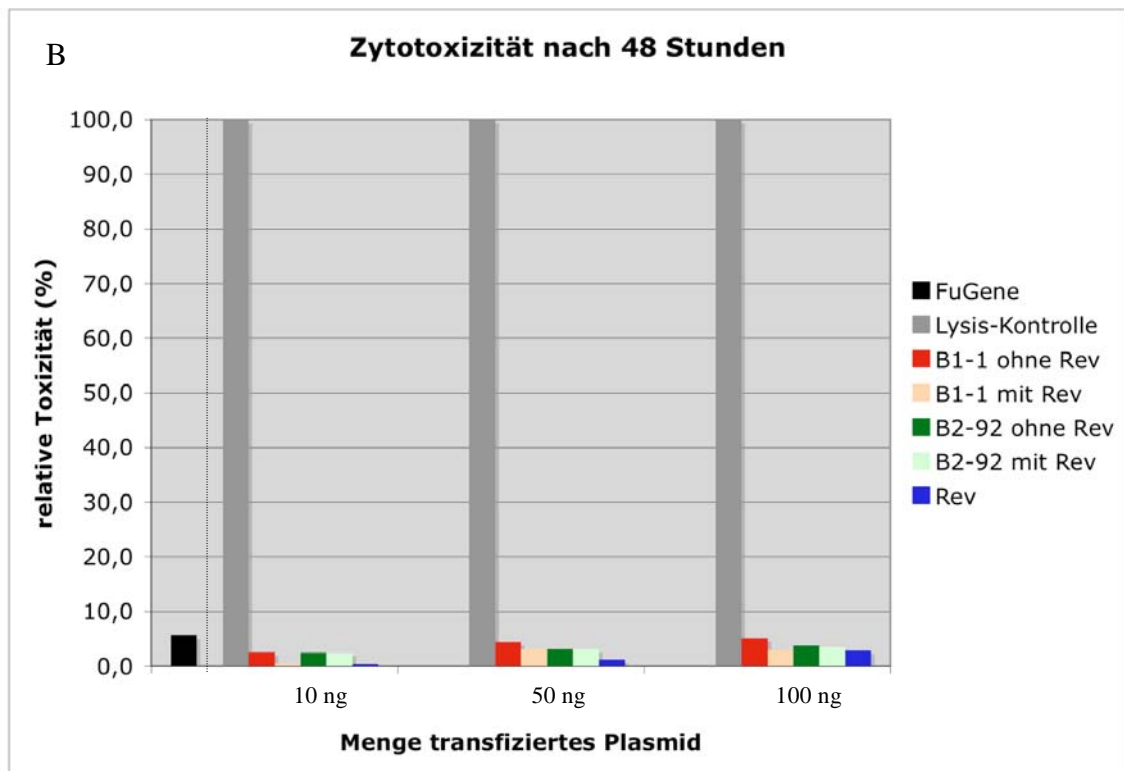
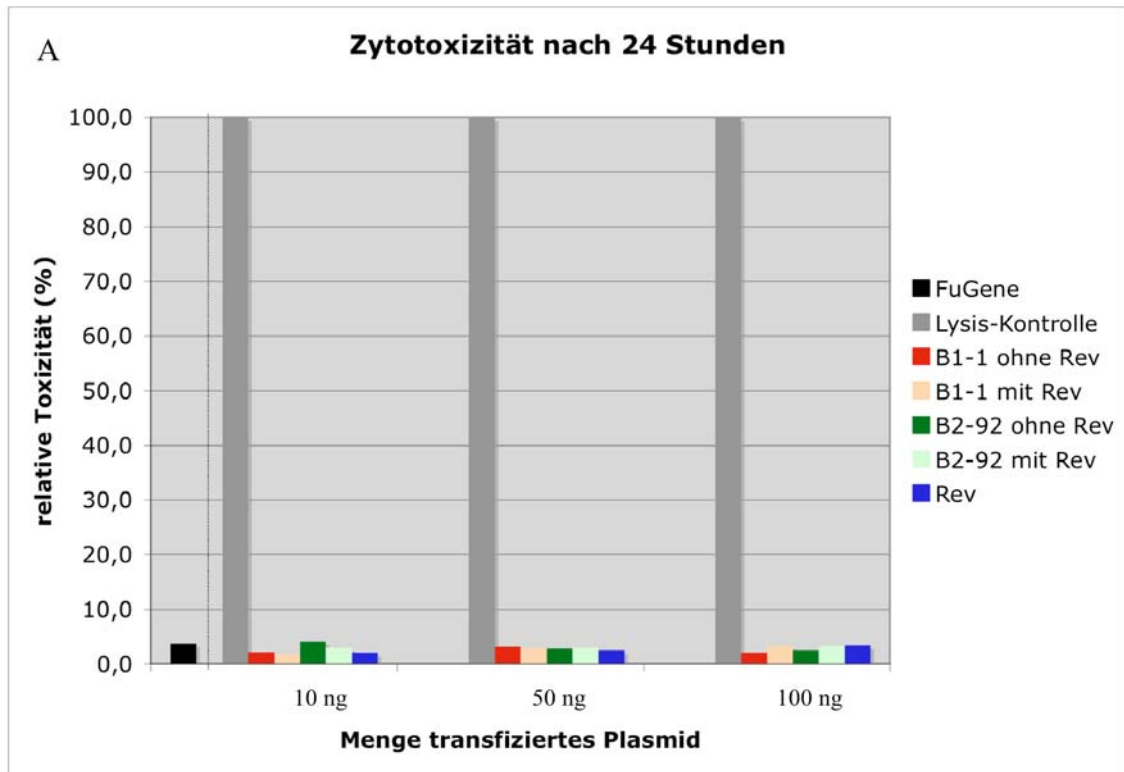


Abbildung 31 A und B: Relative zytotoxische Wirkung der Faktoren B1-1 und B2-92 und des Rev-Proteins auf HeLa Zellen, gemessen mit dem CytoTox-ONE Assay (Promega) nach 24 Stunden (A) bzw. nach 48 Stunden (B) nach Transfektion. Zur Durchführung siehe Tabelle 7 und Text.

Tabelle 7 und Abbildung 31 zeigen die erhaltenen Ergebnisse. Insgesamt ist für keinen der Faktoren B1-1 und B2-92 eine deutliche Zytotoxizität mit dem CytoTox-ONE Assay feststellbar, weder alleine noch in Kombination mit Rev. Für das Rev-Protein selbst kann ebenfalls nach 24 oder 48 Stunden keine wesentliche Zytotoxizität beobachtet werden (für mögliche Gründe siehe 4.4.3). Dieses Ergebnis ist unabhängig von der untersuchten Expressionsdauer (24 bzw. 48 Stunden) des Faktors oder der transfizierten DNA-Menge (10 ng bis 100 ng pro Loch einer 96-Loch-Platte). Das Experiment wurde mehrfach wiederholt, wobei sich stets dasselbe Ergebnis zeigte, siehe Tabelle 7 Standardabweichung. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde parallel zur 96-Loch-Platte des Zytotoxizitäts-Tests eine zweite 96-Loch-Platte ausgesät und in gleicher Weise mit den Faktoren transfiziert. Diese Platte wurde mikroskopiert und der Anteil der fluoreszierenden Zellen ausgezählt. Dabei wurde pro Ansatz stets ein repräsentativer Bereich gewählt und deutlich mehr als 100 Zellen ausgezählt. Der Anteil fluoreszierender und damit transfizierter Zellen lag zwischen ca. 38 % und ca. 66 % und nahm generell mit steigender transfizierter DNA-Menge zu.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß im CytoTox-ONE Zytotoxizitäts-Test weder B1-1 noch B2-92 in HeLa-Zellen Toxizität zeigten. Dieses Ergebnis bezieht sich auf die untersuchte Expressionsdauer der transfizierten Faktoren von 24 bzw. 48 Stunden und die transfizierten DNA-Mengen (bis 100 ng pro Loch einer 96-Loch-Platte).

4 Diskussion

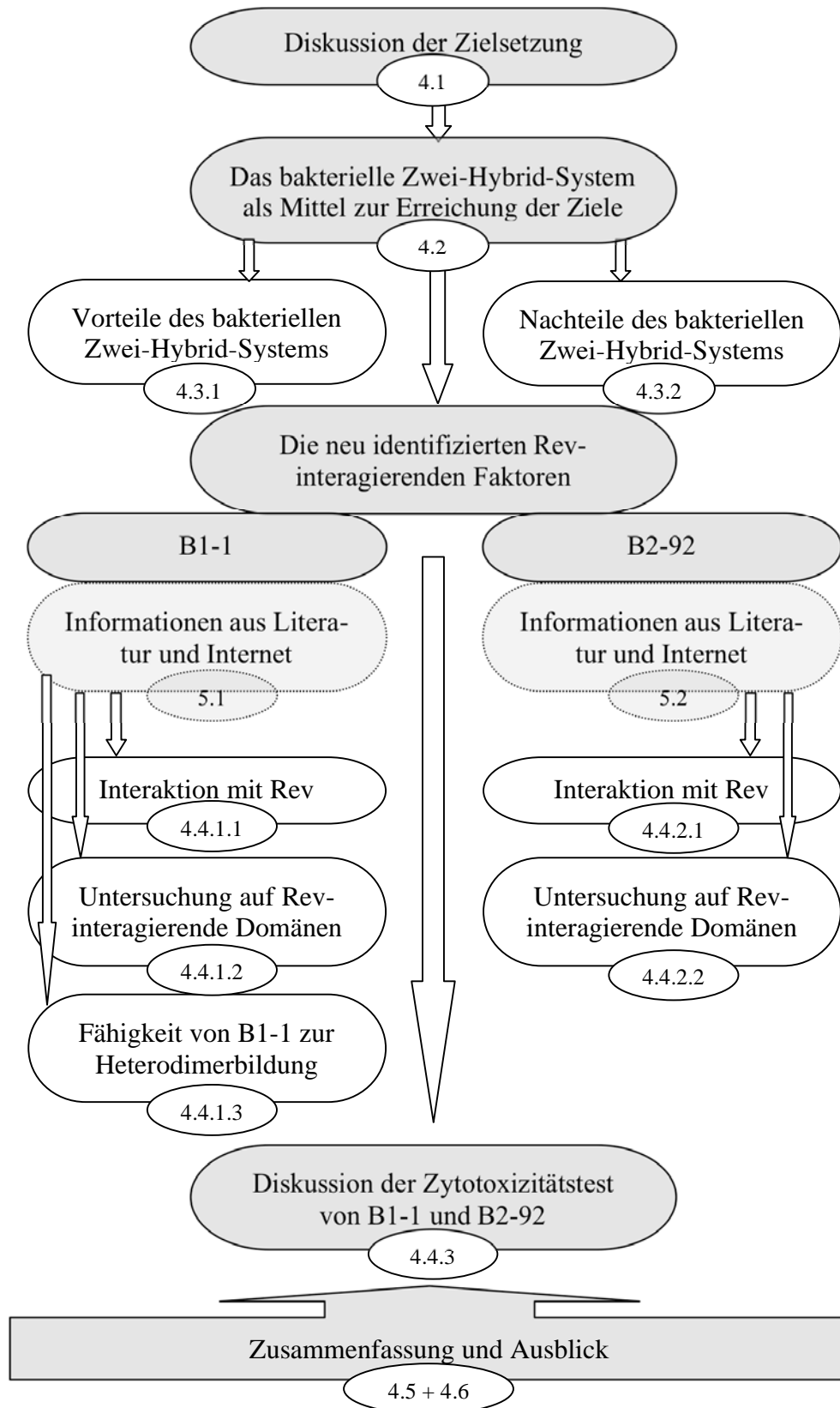


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Ablaufs der Diskussion.

Der Aufbau der Diskussion ist in Abbildung 32 dargestellt. Zunächst wird dargelegt, was zur Zielsetzung dieser Arbeit führte und wie diese Arbeit dazu beiträgt, neue wertvolle wissenschaftliche Erkenntnisse zu gewinnen. Dann wird erläutert, warum das bakterielle Zwei-Hybrid-System das geeignete Mittel zur Erreichung des Ziels ist, und zwar unter Abwägung aller Vor- und Nachteile dieses Systems. Schließlich werden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse diskutiert. Im Anhang ist ausführlich dargestellt, was über die zugehörigen Proteine voller Länge der neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren in der Literatur bekannt ist (siehe 5.1 und 5.2). Die Ergebnisse dieser Arbeit werden interpretiert und Möglichkeiten für künftige Experimente abgeleitet. Den Schluß bilden die Zusammenfassung und ein Ausblick auf mögliche zukünftige Untersuchungen.

4.1 Diskussion der Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Rev-interagierende zelluläre Proteine zu finden, die mit Rev möglichst direkt und stark interagieren sollen (siehe 1.4). Proteine, die Rev stärker binden als die für die Rev-Funktion nötigen zellulären Faktoren oder weitere Rev-Moleküle (Rev-Oligomerisierung) werden mit großer Wahrscheinlichkeit Rev sequestrieren, somit Rev bei der Ausübung seiner Funktion im viralen Replikationszyklus behindern und sich so inhibitorisch auf die HIV-Replikation auswirken. Ein solcher Faktor könnte eventuell einen Kandidaten für ein zukünftiges HIV-Therapeutikum darstellen. Nun gibt es aber schon eine Reihe verschiedener HIV-Therapeutika und mit der HAART Therapie etablierte Methoden der antiviralen Medikation, siehe 1.3.1. Trotzdem besteht weiterhin großer Bedarf nach neuen antiviralen Strategien, da die gängige HIV-Therapie mit z.T. erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist und es multiresistente Virenstämme gibt, die sich mit den vorhandenen Therapeutika nicht bekämpfen lassen. Das HIV-Rev-Protein nimmt eine zentrale Rolle im Replikationszyklus von HIV ein (siehe 1.1.6, 1.2.1) und stellt so einen vielversprechenden Angriffspunkt für antivirale Strategien dar. Zur Zeit gibt es jedoch keine etablierte HIV-Therapie, die am HIV Rev-Protein ansetzt. Daher ist es ein Ziel dieser Arbeit, zelluläre Proteine zu finden, die potentiell eine hemmende Wirkung auf Rev ausüben. Da es sich dabei um zelluläre Proteine oder Fragmente hiervon handelt, ist die Wahrscheinlichkeit, daß diese Proteine toxisch sind, sehr gering im Gegensatz zu z.B. synthetischen chemischen Wirkstoffen. Des weiteren würden diese Proteine oder Fragmente

hiervon wahrscheinlich auch nicht immunogen wirken, da das Immunsystem gegenüber diesen zellulären Proteinen tolerant sein sollte.

Die Identifizierung neuer Rev-interagierender zellulärer Proteine kann darüber hinaus dazu beitragen, Erkenntnisse über die Virus-Wirt-Interaktion zu erhalten. So gibt es noch offene Fragen im Replikationszyklus von HIV, z.B. die Frage, auf welche Weise die virale RNA in das Viruspartikel gelangt. Die Identifizierung neuer zellulärer Interaktionspartner für HIV-Proteine kann helfen, solche offenen Fragen zu klären.

Das bakterielle Zwei-Hybrid-System bietet die neuartige Möglichkeit, Rev-interagierende Proteine zu identifizieren, die Rev mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt binden. Mit herkömmlichen biochemischen Methoden oder dem Hefe-Zwei-Hybrid-System werden Proteine gefunden, die sowohl direkte als auch indirekte Interaktionspartner darstellen können. Die Verwendung des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems ermöglicht die Zielsetzung aufzustellen, aus der sehr großen Anzahl verschiedener Proteine, die von einer cDNA-Bibliothek codiert werden, solche Rev-interagierenden Proteine zu finden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Rev direkt binden (vgl. 4.2.2). Ob die so gefundenen Interaktoren auch tatsächlich in humanen Zellen direkt mit Rev interagieren kann zukünftig mit entsprechenden Experimenten überprüft werden. Der Vorteil direkter Interaktoren in therapeutischer Hinsicht ist, daß sie direkt auf Rev einwirken ohne weitere Proteine, die bei indirekter Interaktion zwischen Rev und dem neu identifiziertem Faktor vermitteln („Brücken-Proteine“), zu beeinflussen. So würden keine ungewollten und unkontrollierbaren Prozesse in der Zelle durch Beeinflussung des Brücken-Proteins stattfinden. Weiterhin kann die Dosis eines Rev-interagierenden Proteins gesenkt werden, wenn es direkt auf Rev einwirkt, also nicht erst alle Brücken-Proteine binden muß und erst dann indirekt auf Rev einwirkt.

Das Vorhaben, ein neues Rev-inhibitorisches Protein zu finden und keine chemische Substanz, die in der Regel leichter zu applizieren ist, stellt eine neuartige Strategie dar. Antiviral wirkende chemische Substanzen verursachen oft eine Reihe unüberschaubarer toxischer Effekte und Nebenwirkungen, wenn sie nicht alleine auf das eine Protein bzw. den Prozeß, das/den es zu blockieren gilt (wie Rev), einwirken, sondern weitere zelluläre Prozesse beeinflussen (vgl. Nebenwirkungen bei der HAART Therapie, 1.3.1). Da Proteine in ihrer Struktur außerordentlich komplex sein können ist es möglich, daß ein Rev-inhibitorisches Protein eine besonders hohe Spezifität für Rev besitzt, wenn dieses Protein nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip auf Rev exakt paßt. Das kann abgesehen vom möglichen therapeutischen Einsatz eines solchen Proteins auch noch den Vorteil bieten, daß Rev durch ein solches Protein in seiner ganzen Länge gebunden und in seiner

Struktur fixiert werden könnte. So wäre es eventuell möglich, Rev mit einem solchen Rev-bindenden Protein zu co-kristallisieren und so die Gesamtstruktur von Rev aufzuklären. Im Vergleich dazu bindet z.B. ein monoklonaler Antikörper nur ein kleines Epitop auf der Oberfläche des Rev-Proteins und fixiert nicht notwendigerweise die gesamte Struktur.

Daher wurde das bakterielle Zwei-Hybrid-System als Mittel, bei dem direkte und starke Interaktionspartner für Rev gefunden werden können, verwendet.

4.2 Verwendung eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems als Mittel zur Identifizierung Rev-interagierender Faktoren

Das Ziel Rev-interagierende Proteine zu finden, die Rev möglichst direkt und mit hoher Affinität binden sollen (siehe 1.4 und 4.1), wurde durch Verwendung eines *Zwei-Hybrid-Systems* (4.2.1) in *Bakterien* (4.2.2) zum Screening einer *humanen fötalen cDNA-Bibliothek aus Gehirn* (4.2.3) verfolgt. Nur im bakteriellen System sind die Wechselwirkungen zwischen den gefundenen Interaktionspartnern mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt, und die Interaktionsstärken sind quantifizierbar.

Nachfolgend werden die charakteristischen Eigenschaften des durchgeführten cDNA-Screenings beschrieben und deren Eignung für die Zielsetzung diskutiert.

4.2.1 Zwei-Hybrid-System

Bei der Suche nach interagierenden Proteinen für ein bestimmtes Protein (in diesem Fall Rev) ist das Screening einer cDNA-Bibliothek mit Hilfe eines Zwei-Hybrid-Systems eine gängige Vorgehensweise (Phizicky und Fields 1995). Beim Zwei-Hybrid-System handelt es sich um ein genetisches System, siehe z.B. Fields und Song (1989) und 2.3. Voraussetzung für ein gutes Screening ist die Qualität der cDNA-Bibliothek, insbesondere deren Konstruktion (Stratagene, siehe 2.3.3) und Präparation (siehe 2.3.4). Der große Vorteil des Zwei-Hybrid-Systems ist, daß es als genetisches System in der Lage ist, auch sehr selten im Gewebe vorkommende Proteine als Interaktoren anzuzeigen. Im Gegensatz dazu ist man bei einem biochemischen System zur Suche nach Interaktoren für ein interessierendes Protein nur in der Lage, solche Proteine zu finden, die in ausreichenden Mengen

exprimiert werden (Notwendigkeit der Detektion in SDS-PAGE und nachfolgender Identifizierung – siehe z.B. Phizicky und Fields (1995)). Ein weiterer wesentlicher Vorteil des Zwei-Hybrid-Systems im Vergleich zu nicht-genetischen Methoden ist, daß die DNA-Sequenz eines Interaktors sofort verfügbar ist. Ein Nachteil des Zwei-Hybrid-Systems ist, daß man nur Interaktionspartner identifizieren kann, die als Fusionsproteine im Kontext des Zwei-Hybrid-Systems „funktionieren“, d.h. zum Beispiel fremde Proteine binden können und die Aktivität der fusionierten bakteriellen Domänen nicht behindern.

4.2.2 Bakteriell System

Durch Screening einer humanen cDNA-Bibliothek auf Rev-Interaktoren in einem bakteriellen System wird erreicht, daß die einzigen eukaryontischen bzw. viralen Proteine, die exprimiert werden, die der cDNA-Bibliothek bzw. Rev sind. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß aus der cDNA-Bibliothek direkte Rev-Interaktoren gefunden werden können, da weitere humane zelluläre Proteine, die diese Interaktion überbrücken könnten, fehlen, siehe auch Hu et al. (2000). Andererseits besteht theoretisch die Möglichkeit, daß die Interaktion zwischen Rev und einem neu identifizierten interagierenden Protein durch ein bakterielles Protein überbrückt wird. Dies muß durch Bestätigung der Interaktion im humanen System ausgeschlossen werden, was für die beiden in dieser Arbeit gefundenen neuen Rev-Interaktoren gelang (siehe 3.2.2).

Eine wichtige Voraussetzung für das Screening auf Rev-Interaktoren im bakteriellen System ist, daß Rev in Bakterien möglichst Struktur und Funktion wie in humanen Zellen besitzt und daß posttranslationale Modifikationen, wie sie in humanen Zellen stattfinden können, wenn überhaupt, eine untergeordnete Rolle spielen. Es gibt in der Literatur eine Reihe von Hinweisen, daß diese Voraussetzungen erfüllt sind. So konnten Fischer et al. (1994) zeigen daß rekombinant in Bakterien hergestelltes und gereinigtes Rev-Protein nach Mikroinjektion in *Xenopus*-Oocyten RRE-RNA zu exportieren vermag und damit wesentliche Funktionen für den viralen Kontext erfüllt. Des weiteren sind viele Studien zur Oligomerisierung und RRE-Bindung von Rev mit rekombinantem Rev aus Bakterien durchgeführt worden, siehe z.B. Daly et al. (1989); Zapp et al. (1991); Thomas et al. (1998) oder Surendran et al. (2004), was zeigt, daß auch diese wichtigen Eigenschaften von Rev in Bakterien gegeben sind. Schließlich sind mit Hilfe von rekombinantem bakteriellen Rev-Protein schon Rev-interagierende Proteine identifi-

ziert worden, wie z.B. das B23-Protein (Fankhauser et al. 1991).

Das alles legt nahe, daß der Versuch, neue Rev-Interaktoren zu finden, durch Screening einer humanen cDNA-Bibliothek in Bakterien eine sinnvolle und erfolgsversprechende Vorgehensweise ist.

4.2.3 Humane fötale cDNA-Bibliothek aus Gehirn

Rev ist für seine Funktion auf die Interaktion mit einer Vielzahl zellulärer Proteine angewiesen, siehe z.B. Kjems und Askjaer (2000) und 1.2.1. Die Funktion von Rev kann zelltyp-spezifisch moduliert sein. So zeigt Rev z.B. in Astrozyten eine verringerte Funktion, und dementsprechend ist die HIV-Replikation in Astrozyten vermindert, siehe z.B. Ludwig et al. (1999) und Brack-Werner (1999). Eine inhibierende Eigenschaft des Rev-Imports ist im Zytoplasma von Astrozyten lokalisiert und kann auf Rev-permissive Zellen übertragen werden (Neumann et al. 2001), was mit der Existenz eines Proteins im Zytoplasma von Astrozyten, das den Import von Rev inhibiert, erklärt werden könnte. Um ein solches oder andere Rev-interagierende Proteine finden zu können, wurde eine cDNA-Bibliothek aus Gehirn gescreent.

In fötalem Gewebe ist die Expression generell oft stärker als in adultem Gewebe (siehe z.B. Expressionsprofil von GST A4, im Anhang 5.1.5). Daher wurde eine fötale cDNA-Bibliothek verwendet.

4.3 Kritik des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems BacterioMatch von Stratagene

Für das Screening nach Rev-interagierenden Faktoren in einer cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn wurde das bakterielle Zwei-Hybrid-System BacterioMatch von Stratagene verwendet. Dies ist zur Zeit das einzige kommerziell verfügbare bakterielle Zwei-Hybrid-System.

4.3.1 Vorteile des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems BacterioMatch von Stratagene

Dieses System bietet eine Reihe von Vorteilen. Zunächst erlaubt nur das bakterielle System mit großer Wahrscheinlichkeit direkte Rev-Interaktoren zu finden, siehe 4.2. Weiterhin ermöglicht das BacterioMatch-System, die Screening-Bedingungen so anzupassen, daß vor allem stark bindende Rev-Interaktoren gefunden werden können (siehe 3.1.2). Die Interaktionsstärke der beiden Interaktoren ist mit einem β -Galactosidase-Assay leicht zu quantifizieren (siehe 3.2.1.1), da die Reporteraktivität zur Stärke der Interaktion von Bait und Target proportional ist (Shaywitz et al. 2002; Dove et al. 1997).

Ein weiterer Vorteil des BacterioMatch-Systems ist die Möglichkeit, viel größere cDNA-Bibliotheken zu screenen als dies z.B. mit dem Zwei-Hybrid-System aus Hefe möglich ist. Der Grund hierfür liegt in der hohen Transformations-Effizienz von Bakterien (10^9 im Vergleich zu 10^6 in Hefe – siehe Joung (2001) und Joung et al. (2000)). Bedingt durch deren Konstruktion ist das Screening einer möglichst großen cDNA-Bibliothek von Vorteil. Die mRNA eines Gewebes ist durch die 3' PolyA-Sequenz charakterisiert. Der erste Strang der cDNA wird mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers in 3' -> 5' Richtung synthetisiert (siehe auch 2.3.3) und bricht zufällig in der mRNA-Sequenz ab. Dadurch wird die Länge der cDNA bestimmt. Die fertige cDNA wird in das Target-Plasmid inkloniert, wobei die cDNA-Sequenz an das 3' Ende des RNA-Polymerase α Gens angehängt wird. Je nachdem an welcher Stelle der Abbruch der Synthese des ersten Stranges der cDNA erfolgte, werden von dieser cDNA im Target-Plasmid unterschiedliche Proteine exprimiert, siehe Abbildung 33. Das von der template mRNA im Gewebe exprimierte Protein bzw. ein Fragment hiervon kann von der cDNA im Target-Plasmid codiert werden, falls der Abbruch der Synthese des ersten Stranges der cDNA im codierenden Bereich (ORF = open reading frame) so erfolgte, daß die cDNA-Sequenz im richtigen Leserahmen vorliegt, siehe Abbildung 33 b. Allerdings wird dieses von der cDNA exprimierte Protein im Vergleich zum Protein des Gewebes in den meisten Fällen aminoterminal verkürzt sein, da der Abbruch der Synthese des ersten Stranges der cDNA in den seltensten Fällen zufällig genau beim Start-ATG erfolgt. Falls der Abbruch im 5'-untranslatierten Bereich (leader) erfolgte, kann von der cDNA ein Protein exprimiert werden, das dem von der template mRNA im Gewebe exprimierte Protein entspricht, wobei diesem aber Aminosäuren, die von der Translation des 5'-untranslatierten Bereichs stammen, vorgehen. Das ist jedoch nur möglich, wenn die cDNA-Sequenz im richtigen Leserahmen vorliegt, und sich im 5'-untranslatierten Bereich keine Stop-Codons

befinden, siehe Abbildung 33 c. In allen anderen Fällen codiert die cDNA nicht für das von der template mRNA im Gewebe exprimierte Protein oder Teile hiervon. Da also nur ein Teil der in einer cDNA-Bibliothek vorhandenen cDNAs das Protein, das dem von der zugehörigen template mRNA im Gewebe exprimierten Protein oder Teilen hiervon entspricht, exprimieren können, ist es wünschenswert, eine möglichst große cDNA-Bibliothek durchsuchen zu können. Dafür ist das bakterielle System mit seiner hohen Transformations-Effizienz besonders geeignet.

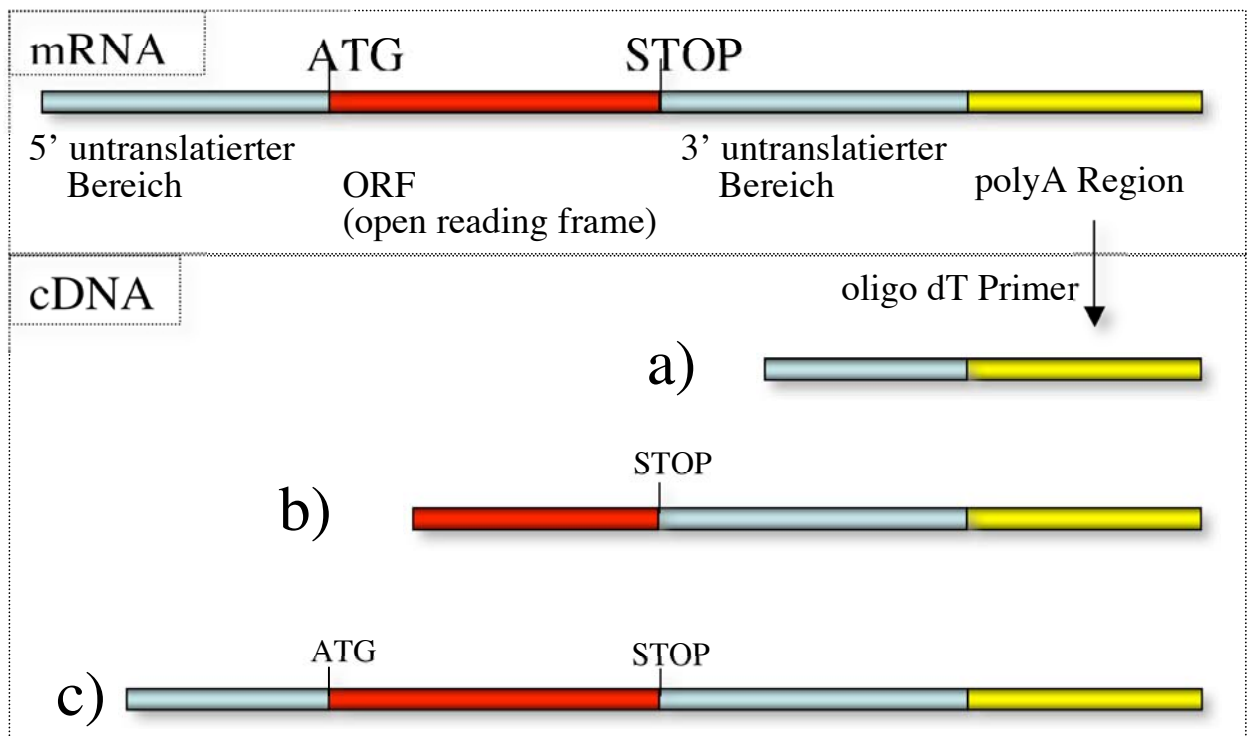


Abbildung 33: Schematische Darstellung der mRNA-Bereiche, die in der cDNA-Bibliothek repräsentiert sind. a) die cDNA reicht nur in den 3' untranslatierten Bereich – daher ist keine Expression des ORF möglich; b) die cDNA reicht in den ORF hinein – der ORF wird aber nur korrekt exprimiert, wenn die cDNA im richtigen Leserahmen vorliegt; das von der cDNA exprimierte Protein wird dann aber in den meisten Fällen im Vergleich zum Protein, das vom ORF der mRNA exprimiert wird, N-terminal verkürzt sein; c) die cDNA reicht über den ORF hinaus in den 5' untranslatierten Bereich – der ORF kann nur dann korrekt exprimiert werden, wenn die cDNA im richtigen Leserahmen vorliegt und wenn sich im davor befindlichen Teil des 5' untranslatierten Bereichs kein Stop Codon befindet; das von dieser cDNA exprimierte Protein hat im Vergleich zum Protein, das vom ORF der mRNA exprimiert wird, am N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, die von der Translation des vor dem ORF befindlichen Teils des 5' untranslatierten Bereichs stammen.

Bei der BLAST-Analyse der neu gefundenen Rev-Interaktoren wurden die eben beschriebenen Umstände berücksichtigt. So wurde nicht nur die zum gefundenen Interaktor gehörende mRNA Sequenz durch das Programm „BLASTn“ (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides) ermittelt, sondern auch über eine Suche

mit Hilfe des Programms „BLASTp“ (Basic Local Alignment Search Tool for proteins) kontrolliert, ob das vom pTRG-cDNA Plasmid exprimierte Protein dem von der korrespondierenden mRNA exprimierten Protein entspricht und ob es im humanen Proteom weitere Proteine gibt, die dem gefundenen neuen Rev-Interaktor ähnlich sind (siehe 2.2.8).

Ein mögliches Problem, das aus dem Screening einer sehr großen cDNA-Bibliothek erwächst, ist die Gefahr, daß falsch Positive in großer Zahl auftreten, wenn der Anteil der falsch Positiven nicht sehr niedrig gehalten werden kann. Diese Gefahr wurde in dieser Arbeit minimiert, da der zu erwartende Anteil falsch Positiver sehr genau bestimmt wurde und mit weniger als 0,006 % einen sehr niedrigen Wert aufwies (siehe 3.1.2).

Die Möglichkeit, Proteine zu finden, die im Zwei-Hybrid-System in Hefe nicht gefunden werden können, da sie in Hefe toxisch sind oder schlecht exprimiert werden, ist ein weiterer Vorteil des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems (Hu et al. 2000).

Außerdem fällt im bakteriellen System die Notwendigkeit weg, die Zwei-Hybrid-Fusionsproteine über eine Signalsequenz (NLS) in den Zellkern zu lokalisieren, um dort das Reporteragen aktivieren zu können, was in allen eukaryontischen Zwei-Hybrid-Systemen notwendig ist. Falls ein Protein, das von der cDNA exprimiert wird, andere Signalsequenzen (wie z.B. ein NES) trägt, könnten beide Signalsequenzen miteinander interferieren, so daß das Reporteragen nicht mehr aktiviert werden kann (Joung et al. 2000).

4.3.2 Nachteile des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems Bacterio-Match von Stratagene

Grundsätzlich besteht beim Screening auf Rev-Interaktoren mit Hilfe eines bakteriellen Systems die Gefahr, daß die in Bakterien exprimierten humanen Proteine nicht den Proteinen in humanen Zellen gleichen und daher im bakteriellen Zwei-Hybrid-System keine Interaktion zeigen. So werden in *E. coli* Proteine nicht posttranslational modifiziert, wie z.B. durch Glykosylierung, und es ist auch möglich, daß die Faltung der Proteine in Bakterien anders ist als die in humanen Zellen. Wie schon in 4.2 erwähnt, sind jedoch in der Literatur viele Fälle beschrieben, in denen Rev als bakterielles rekombinantes Protein eingesetzt wurde,

und mit einem solchen bakteriellen Rev-Protein sind auch schon Rev-Interaktoren identifiziert worden. Daher erscheint der Einsatz von Bait-Rev im BacterioMatch-System sinnvoll. Andererseits betrifft die Problematik, daß ein in Bakterien exprimiertes humanes Protein sich möglicherweise anders verhält als das aus humanen Zellen stammende Protein, natürlich auch die Target-Proteine aus der cDNA-Bibliothek. So ist es möglich, daß Rev-interagierende Proteine, die für die Interaktion z.B. auf posttranslationale Modifikationen angewiesen sind, im bakteriellen System nicht gefunden werden können. Dies ist aber kein gravierender Nachteil, da die vorliegende Arbeit keinen Anspruch erhebt, sämtliche Proteine, die zur Interaktion mit Rev fähig sind, finden zu können.

Die besonderen Gegebenheiten des BacterioMatch-Systems von Stratagene bringen eine Problematik mit sich. So wird im Protokoll zum BacterioMatch-System von Stratagene immer wieder eine mögliche Toxizität von Proteinen in *E. coli* betont, insbesondere von Proteinen im Target-Kontext. Diese Toxizität konnte auch durch persönliche Beobachtungen bestätigt werden und kann mit Hilfe von Abbildung 34 illustriert werden.

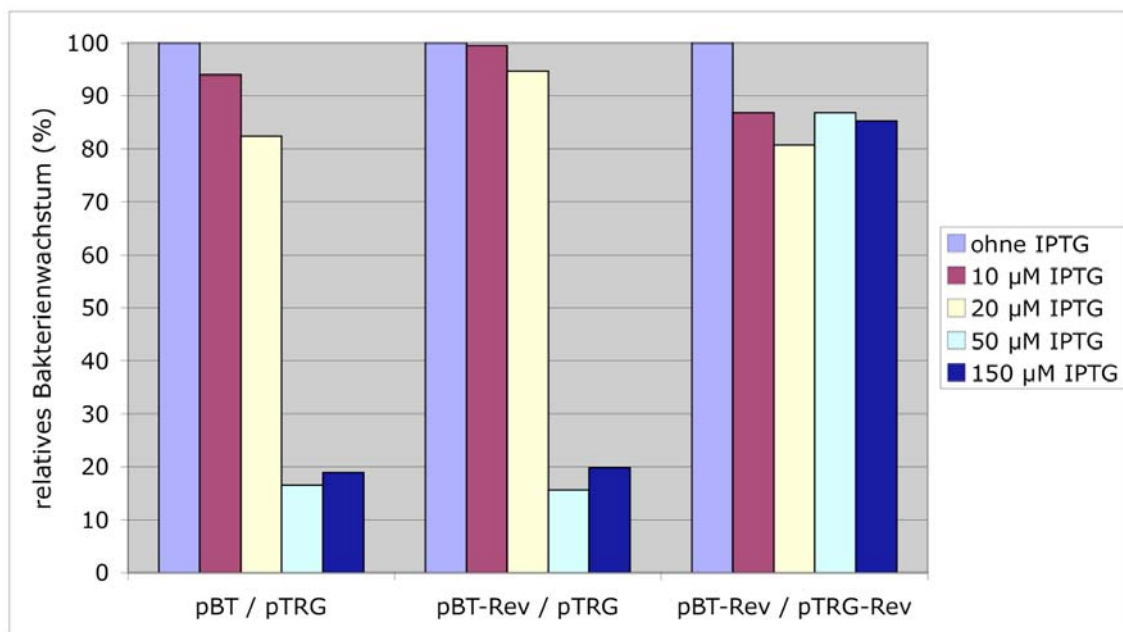


Abbildung 34: Illustration der Toxizität anhand des Bakterienwachstums nach unterschiedlich starker Induktion der Expression von Bait und Target durch verschiedene IPTG-Konzentrationen. Erklärung siehe Text.

In Abbildung 34 ist dargestellt, wie unterschiedliche IPTG-Konzentrationen sich auf das Wachstum der Bakterien mit unterschiedlichen Bait-Target-Kombinationen auswirken. BMI Zellen wurden mit den angegebenen Kombina-

tionen an Bait- und Target-Plasmiden cotransformiert. Für jeweils eine Bait-Target-Kombination wurden 5 Ansätze mit jeweils unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen von 0 bis 150 μM IPTG jeweils mit gleicher Bakterienzahl inokuliert und nach ca. 14 Stunden Wachstum die OD(600) als Maß für das Bakterienwachstum gemessen. Die OD(600) des Ansatzes ohne IPTG wurde jeweils auf 100 % gesetzt. In Abbildung 34 ist zu sehen, daß die Ansätze pBT/pTRG und pBT-Rev/pTRG, bei denen jeweils keine Bait-Target-Interaktion stattfinden kann, bei höheren IPTG-Konzentrationen (50 und 150 μM IPTG) ein deutlich vermindertes Wachstum zeigen. Bei der Rev-Rev-Interaktion hingegen ist dieses deutliche Absinken des Wachstums nicht zu beobachten.

Da diese Toxizität vor allem bei Expression des Fusionspartners der Target-Proteine, nämlich der N-terminalen Region der RNA Polymerase α -Untereinheit aus *E. coli*, auftritt, liegt es nahe, daß diese in sich toxisch ist.

Abbildung 35 zeigt schematisch die Rolle der α -Untereinheit der RNA Polymerase bei der Transkription in *E. coli* und die möglichen Auswirkungen der Manipulation der α -Untereinheit im bakteriellen Zwei-Hybrid-System BacterioMatch. Die N-terminale Region der RNA Polymerase α -Untereinheit bewirkt die Assemblierung des vollständigen funktionstüchtigen RNA-Polymerase-Komplexes am Promotor (Ebright und Busby 1995). Die C-terminale Domäne der RNA Polymerase α -Untereinheit bindet normalerweise bestimmte DNA-Sequenzen oberhalb (upstream) des Promotors (Course et al. 2000) und wird von einer Reihe von Transkriptions-Aktivatoren gebunden – siehe Abbildung 35, A, siehe z.B. Hochschild und Dove (1998) oder Busby und Ebright (1999). Das führt dazu, daß das RNA Polymerase Holoenzym eine Konformationsänderung erfährt, die Transkription initiiert und den Promotor verläßt, so daß weitere RNA Polymerase Komplexe dort assemblieren können, siehe z.B. Rhodius und Busby (1998). Für die Aktivierung der Transkription reicht es schon aus, wenn die RNA Polymerase α -Untereinheit die DNA kontaktieren kann (Hochschild und Dove 1998). Darauf basiert das Prinzip des BacterioMatch-Systems. Target-Proteine enthalten nur die N-terminale Region der RNA Polymerase α -Untereinheit und können die Assemblierung der RNA Polymerase am Promotor bewirken, was aber lediglich eine niedrige Basal-Transkription bewirkt. Erst wenn eine Interaktion mit einem Bait-Protein stattfinden kann, wird über dessen DNA-Bindedomäne die DNA-Bindung erfolgen und die Transkriptionsrate stark erhöht werden – Abbildung 35, C (siehe auch 2.3 und Dove et al. (1997)).

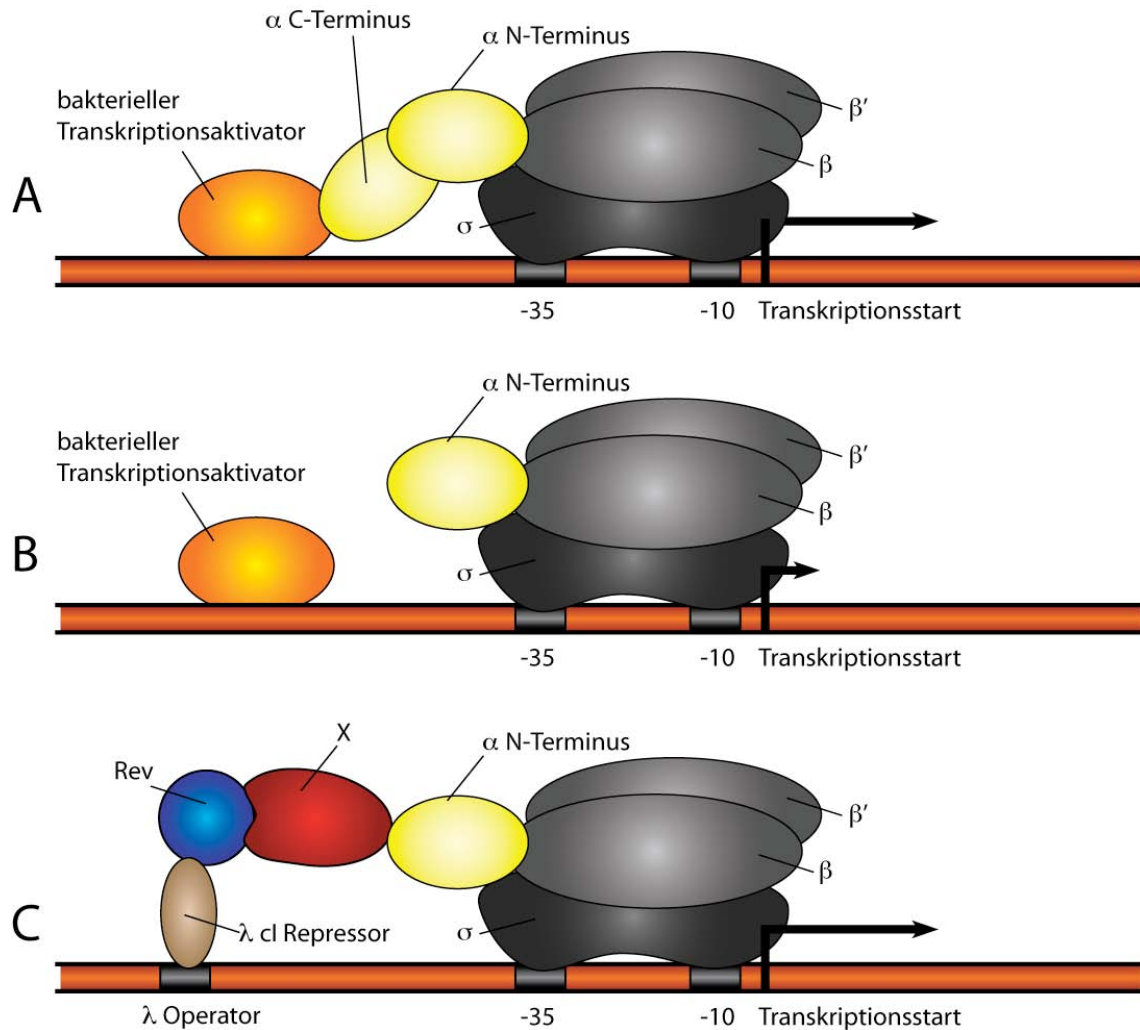


Abbildung 35: Vereinfachte schematische Darstellung verschiedener Aspekte der bakteriellen Transkriptionsaktivierung. **A:** natürliche Situation in Bakterien – der N-Terminus der α -Untereinheit führt zur Assemblierung des RNA-Polymerase Holoenzym bestehend aus den Untereinheiten β , β' , σ und α am Promotor; ein bakterieller Transkriptionsaktivator, der über den C-Terminus der α -Untereinheit gebunden wird, steigert die Transkriptionseffizienz stark. **B:** eine α -Untereinheit der RNA-Polymerase, bei der der C-Terminus entfernt wurde, wird zur Assemblierung der RNA-Polymerase an bakteriellen Promotoren führen, ohne daß bakterielle Transkriptionsaktivatoren Einfluß auf die Transkription nehmen können – diese Situation liegt im BacterioMatch-System vor, wenn ein beliebiges pTRG-Plasmid überexprimiert wird – sämtliche bakteriellen Promotoren können von solchen nicht aktivierbaren RNA Polymerase-Komplexen besetzt und deren normale Transkription behindert werden, was zur Beeinträchtigung des Wachstums („Toxizität“) führen wird. **C:** der Promotor des BacterioMatch Reporters enthält einen λ -Operator und wird vom λ cl Repressor des Bait-Proteins gebunden – wenn Bait und Target miteinander interagieren wird dies zum Abzug der RNA Polymerase Komplexe, deren α -Untereinheit vom Target-Protein stammt, von normalen bakteriellen Promotoren führen, die Bait-Target-Paare werden hauptsächlich an den Reporter-Promotor rekrutiert und aktivieren dort die Transkription der Reportergene. Auf diese Weise ist das Wachstum von Bakterien mit nicht interagierenden Bait-Target-Kombinationen beeinträchtigt, wohingegen Bakterien mit einem interagierenden Bait-Target Paar kaum im Wachstum beeinträchtigt sein sollten – vgl. Abbildung 34.

Target-Fusionsproteine werden aber auch zur Assemblierung von RNA Polymerase Komplexen an sämtlichen *E. coli* Promotoren führen. Die Transkription von

diesen *E. coli* Promotoren ist aber beeinträchtigt, da die RNA Polymerase α -Untereinheit aufgrund des Fehlens des C-Terminus keine Kontakte zur DNA herstellen oder Transkriptionsaktivatoren binden kann, siehe Abbildung 35, B. Das wird bewirken, daß sämtliche Transkriptionsvorgänge in *E. coli* nicht optimal ablaufen können und zu einer Wachstumsverzögerung führen („Toxizität“). Dieses Phänomen wird um so stärker ausgeprägt sein, je mehr Target-Proteine in der Bakterienzelle vorliegen, da endogene vollständige RNA Polymerase α -Untereinheiten durch RNA Polymerase α -Untereinheiten ohne C-terminale Domäne, die von den Target-Proteinen stammen, verdrängt werden. Es ist also eine zunehmende Wachstumshemmung mit steigender IPTG-Konzentration (mehr Target-Moleküle pro Bakterienzelle) zu erwarten, siehe Abbildung 34. Allerdings sollten Target-Moleküle in der Bakterienzelle weggefangen werden, wenn sie mit Bait-Molekülen interagieren. Die Target-Moleküle werden bei Bait-Target-Interaktion an den Reporter-Promotor dirigiert (Abbildung 35, C) und können dann die normalen *E. coli* Promotoren nicht mehr „blockieren“ (Abbildung 35, B). Es ist also bei Bait-Target-Interaktion mit einer verringerten Toxizität zu rechnen (siehe Abbildung 34, Ansatz pBT-Rev/pTRG-Rev). Dieser eben beschriebene Prozeß wird dazu führen, daß bei einem cDNA-Screening das Wachstum von Interaktoren noch akzentuiert wird.

Eine weitere Art von Toxizität ist die durch Expression rekombinanter humaner Proteine direkt (unabhängig von der N-terminalen Region der RNA Polymerase α -Untereinheit) in *E. coli* verursachte Toxizität. Diese Toxizität wird dazu führen, daß einige humane Proteine nicht in der cDNA-Bibliothek repräsentiert sind. Um auch das Wachstum von Proteinen, die für *E. coli* toxisch sind, zu erleichtern, erfolgte die Inkubation bei Verwendung von LB-Medium bei 30 °C.

Ein weiterer Nachteil des BacterioMatch-Systems ist, daß die Reporter-Bakterienzellen nicht für die Verwendung humaner Codons optimiert sind. So könnten humane cDNAs, die in *E. coli* selten benutzte Codons enthalten, schlecht im BacterioMatch-System exprimiert werden, siehe Sharp und Bulmer (1988) und Grosjean und Fiers (1982), und damit zu einer Unterschätzung der Interaktionsstärke führen bzw. den Reporter eventuell gar nicht mehr aktivieren. Dieses Problem hätte von der Firma Stratagene umgangen werden können, indem ein Bakterienstamm verwendet worden wäre, der zusätzliche tRNAs enthält, die in *E. coli* seltene Codons erkennen. Allerdings werden solche Bakterienstämme in der Regel für die Reinigung rekombinanter Proteine eingesetzt, wenn diese rekombinanten Proteine in großem Maße überexprimiert werden (Kleber-Janke und

Becker 2000). Möglicherweise ist das Fehlen seltener humaner Codons im Reporterstamm des BacterioMatch-Systems kein gravierender Nachteil, da hier eine Expression der Bait- und Target-Proteine auf relativ niedrigem Niveau ausreicht, um die Transkription der Reportergene zu aktivieren. So sind die pBT- und pTRG-Plasmide jeweils low-copy-Plasmide und die Induktion der Bait- und Target-Expression mit 20 μ M IPTG ist ebenfalls eher moderat (siehe 3.1.2)

4.4 Die neu identifizierten Rev-interagierenden Proteine

4.4.1 B1-1 und GST A4

Beim Screening einer humanen cDNA-Bibliothek aus fötalem Gehirn wurde der Faktor B1-1 als neuer Rev-Interaktor entdeckt (siehe Ergebnisse 3.1.3). Das zu B1-1 gehörende Protein voller Länge ist Glutathion-S-Transferase A4 (GST A4). B1-1 entspricht den Aminosäuren 42 bis 222 von GST A4. Im Anhang sind Informationen aus Literatur und Internetdatenbanken zu GST A4 zusammengestellt (siehe 5.1).

Glutathion-S-Transferase A4 besitzt als Enzym die Eigenschaft elektrophile Moleküle, die für die Zelle schädlich sein können, als Substrat zu binden, an Glutathion zu konjugieren und somit unschädlich zu machen, vgl. 5.1.1 und 5.1.3, siehe z.B. Bruns et al. (1999). Darüber hinaus vermag GST A4 weitere potentiell toxisch wirkende Moleküle über die Ligandin-Funktion zu binden, vgl. 5.1.10, und so eine mögliche toxische Wirkung durch diese Moleküle zu verhindern, siehe z.B. Sayed et al. (2002). GST A4 liegt als Dimer in der Zelle vor, vgl. 5.1.9, siehe z.B. Armstrong (1997).

4.4.1.1 Interaktion von B1-1 und GST A4 mit Rev

Beim Screening der cDNA-Bibliothek mit dem bakteriellen Zwei-Hybrid-System sind die Kolonien, die B1-1 repräsentieren, schnell auf Agarplatten mit stringenten Wachstumsbedingungen gewachsen und stellten einen Großteil der beim Screening auf Anreicherungsplatte 1 gewachsenen Kolonien dar (siehe Tabelle 4). Dies ließ darauf schließen, daß es sich bei B1-1 mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Rev-Interaktor, der Rev (zumindest im bakteriellen System) mit hoher

Affinität bindet, handelt. Tatsächlich zeigten die Ergebnisse aus 3.2.1.1, daß im bakteriellen Zwei-Hybrid-System B1-1 deutlich stärker mit Rev interagiert als Rev mit sich selbst (siehe Abbildung 18).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen im bakteriellen System interagiert B1-1 auch im humanen System (hier repräsentiert durch HeLa-Zellen) mit Rev, siehe Ergebnisteil 3.2.2. So zeigt B1-1 eine sehr deutliche Co-Lokalisation mit Rev (siehe 3.2.2.1) und kann zusammen mit Rev bei der Co-Immunopräzipitation gefällt werden (siehe 3.2.2.2). Damit ist in mehreren Systemen unabhängig voneinander die Interaktion von B1-1 mit Rev gezeigt worden. So ist die Interaktion nicht nur in bakteriellen und menschlichen Zellen bestätigt worden, sondern auch durch qualitativ unterschiedliche Methoden: im genetischem System durch das bakterielle Zwei-Hybrid-System, im biochemischen System durch die Co-Immunopräzipitation und im mikroskopischen *in-vivo* System durch die Co-Lokalisation.

Im Gegensatz dazu interagiert GST A4 weder in bakteriellen noch in humanen Zellen mit Rev. So vermag GST A4 die Reporteraktivität zusammen mit Rev im BacterioMatch-System nicht wesentlich über die basale Reporteraktivität zu steigern (siehe Abbildung 19). Ebenso ist weder eine Co-Lokalisation noch Co-Immunopräzipitation mit Rev zu beobachten (siehe 3.2.2.1 und 3.2.2.2).

Für diesen Unterschied zwischen B1-1 und GST A4 hinsichtlich der Interaktion mit Rev gibt es theoretisch folgende Möglichkeiten:

1. Das Fehlen der Interaktion mit Rev im bakteriellen System könnte dadurch zustande kommen, daß das Gen für GST A4 im 5'-Bereich einige Codons enthält, die selten in *E. coli* sind (Nilsson und Mannervik 2001). Demzufolge wäre es möglich, daß GST A4 schlecht im bakteriellen Zwei-Hybrid-System exprimiert wird und eventuell den Reporter nicht aktivieren kann, siehe 4.3.2. Da aber auch in humanen Zellen keine Interaktion von GST A4 mit Rev zu beobachten ist, scheidet diese Möglichkeit aus.

2. Das Fehlen der Interaktion von GST A4 mit Rev kann möglicherweise über die Struktur des GST A4 Proteins erklärt werden. So könnten die in B1-1 fehlenden ersten 41 Aminosäuren eine Interaktion mit Rev verhindern, vgl. 5.1.

Die Struktur von GST A4 ist bekannt (Bruns et al. 1999). Abbildung 36 zeigt die dreidimensionale Struktur von GST A4 und B1-1, basierend auf der PDB Datei 1GUL. Die ersten 41 Aminosäuren wurden dabei aus der Struktur von GST A4 herausgelöscht und so die Struktur von B1-1 konstruiert. Dieses Vorgehen basiert auf der Annahme, daß die Faltung des übrigen Proteins größtenteils unabhängig von den ersten 41 Aminosäuren erfolgt. Ob diese Annahme der Realität entspricht, kann letztendlich nur durch Kristallisation von B1-1 geklärt werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß zumindest der C-Terminus, der durch die in Abbildung 36 rechte globuläre Hälfte repräsentiert wird, sich größtenteils unabhängig vom Rest des Proteins falten kann. Lediglich die Stabilität und Ausbildung der C-terminalen α_9 Helix, die Kontakte zum N-Terminus herstellt (vgl. 5.1.6), wird wahrscheinlich durch das Fehlen der ersten 41 Aminosäuren in B1-1 beeinflusst.

Die Tatsache, daß Rev mit B1-1 interagiert, nicht aber mit GST A4, kann mit folgender Hypothese erklärt werden: Die ersten 41 Aminosäuren blockieren den Zutritt von Rev zu GST A4. Die Bindung von Rev erfolgt vermutlich einerseits in einem Bereich von GST A4, der an der Bindung von Glutathion beteiligt ist, siehe 5.1.6. Andererseits sind an der Bindung von Rev zusätzlich wahrscheinlich Bereiche von GST A4 beteiligt, die zwischen N- und C-terminaler Hälfte liegen (linke und rechte globuläre Hälfte von GST A4 in Abbildung 36) und normalerweise eine Rolle bei der Dimerisierung (siehe 5.1.9) und Ligandin-Funktion (5.1.10) spielen und mit Teilen der Bindestellen für das elektrophile Substrat (H-sites, vgl. 5.1.7) überlappen. Aus der in Abbildung 36 dargestellten hypothetischen B1-1 Struktur wird ersichtlich, daß durch Deletion der ersten 41 Aminosäuren dieser eben beschriebene Bereich zugänglich wird und Rev vermutlich in diesem Bereich mehrere Kontakte mit B1-1 eingeht. Es muß beachtet werden, daß Rev viel größer ist als ein normales Substrat für die Enzym-Funktion von GST A4, wie 4-HNE (vgl. 5.1.1 und 5.1.7) und auch größer als ein Molekül, das normalerweise über die Ligandin-Funktion von GST A4 gebunden wird (vgl. 5.1.10). Rev ist mit 116 Aminosäuren ca. halb so groß wie GST A4 mit 222 Aminosäuren.

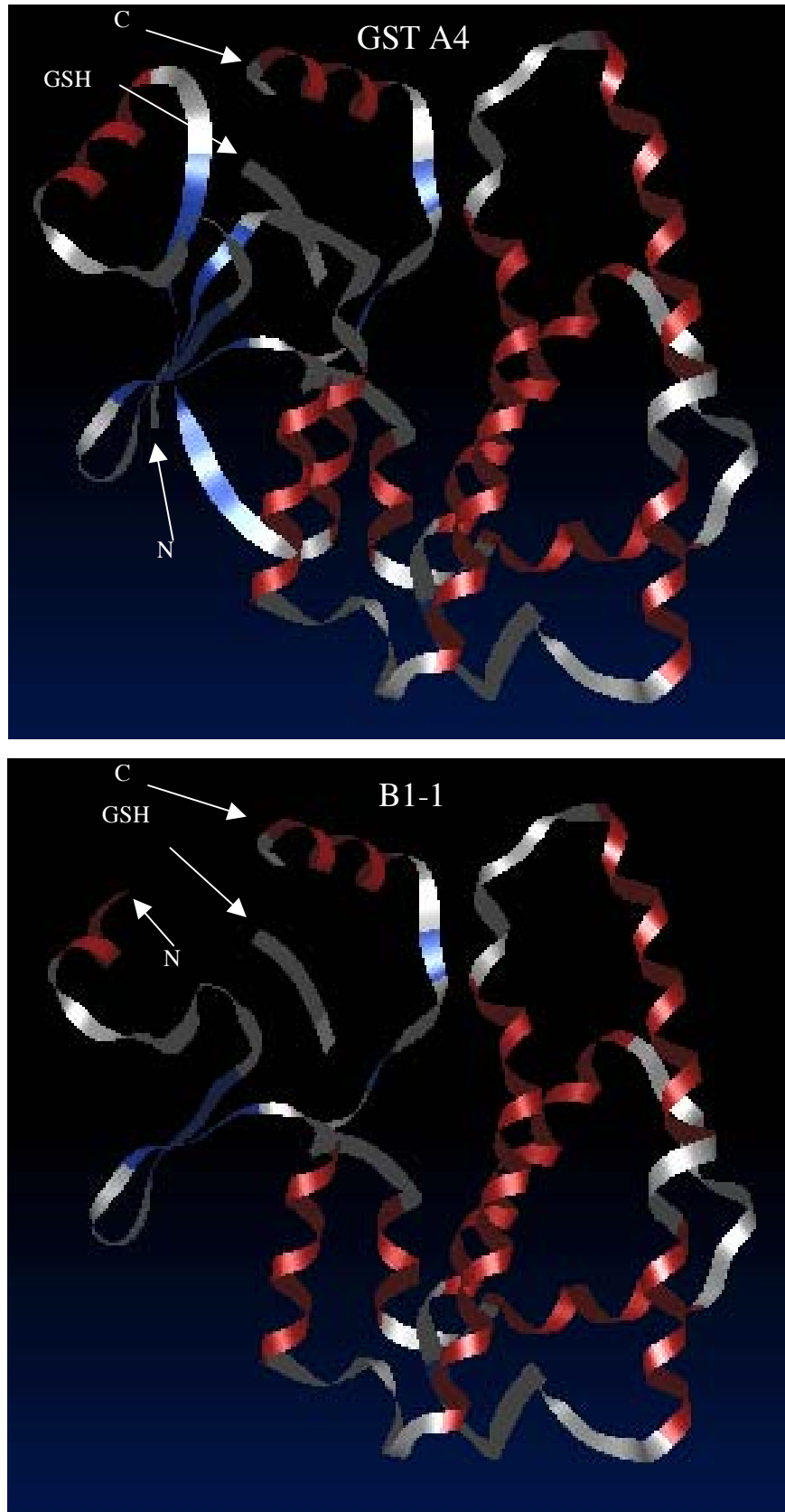


Abbildung 36: Dreidimensionale Struktur von GST A4 und B1-1. Die Strukturen basieren auf der PDB Datei 1GUL und wurden dargestellt mit dem Programm iMol. Rot dargestellte Bereiche repräsentieren α -Helices, β -Faltblattstrukturen sind blau dargestellt. Die Struktur von B1-1 wurde konstruiert, indem die N-terminalen Aminosäuren bis inklusive aa 41 aus der Struktur von GST A4

herausgelöscht wurden. Mit „GSH“ ist Glutathion bezeichnet. Mit „N“ bzw. „C“ sind jeweils der N- bzw. C-Terminus der Proteine bezeichnet.

Das Fehlen der ersten 41 Aminosäuren in B1-1 im Vergleich zu GST A4 wird sich wahrscheinlich auch auf die Fähigkeit, Glutathion und elektrophile Substrate zu binden, auswirken (vgl. 5.1.6, Tabelle 8). So kann vermutet werden, daß B1-1 Glutathion deutlich schlechter als GST A4 oder gar nicht mehr binden kann, da 3 wichtige Aminosäuren von insgesamt 11 Aminosäuren, die an der Bindung von Glutathion beteiligt sind, fehlen, siehe Bruns et al. (1999). Insbesondere fehlt in B1-1 dabei Tyr9, das das Schwefel-Atom in der Thiol-Gruppe von Glutathion für den nukleophilen Angriff durch das Substrat aktiviert, siehe Armstrong (1997); vgl. 5.1.8. Ebenso fehlen wichtige Aminosäuren der Bindestellen für das elektrophile Substrat, so daß vermutet werden kann, daß das für GST A4 normale elektrophile Substrat 4-HNE (4-Hydroxynon-2-enal) nicht mehr gebunden werden kann oder die Spezifität für dieses Substrat verloren gegangen ist, siehe Nilsson et al. (2000); vgl. 5.1.7 und Tabelle 8. Daher kann vermutet werden, daß B1-1 wahrscheinlich keine zu GST A4 vergleichbare enzymatische Aktivität besitzt. Diese Vermutung kann zukünftig durch entsprechende Experimente überprüft werden.

4.4.1.2 Zur Untersuchung der Interaktion verschiedener Domänen von B1-1 / GST A4 mit Rev

B1-1 wurde ursprünglich als Rev-interagierendes Protein durch Screening einer cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn identifiziert. Um genauer zu untersuchen, welche Bereiche in B1-1 für diese Interaktion verantwortlich sind, wurde B1-1 in drei Fragmente unterteilt. Grundlage für diese Unterteilung waren die bekannte Sekundärstruktur (vgl. 5.1.6, Abbildung 45) und Tertiärstruktur (siehe Abbildung 36) des Proteins GST A4 (Bruns et al. 1999), von dem B1-1 die Aminosäuren 42 bis 222 darstellt. Dabei wurde die Annahme zugrundegelegt, daß das Fehlen der ersten 41 Aminosäuren die Struktur des übrigen Proteins nicht wesentlich beeinflusst (siehe 4.4.1.1). Die Gesamtstruktur von GST A4 ist charakterisiert durch zwei strukturelle Domänen, dem N-terminalen und C-terminalen Bereich (vgl. 5.1.6). Diese beiden Bereiche bilden in der Gesamtstruktur zwei globuläre Bereiche, die miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 36). Wahrscheinlich können sich beide Bereiche unabhängig voneinander falten (vgl. 5.1.6). Es wurden daher die beiden Fragmente GST A4 aa 42 bis 81, das dem N-terminalen Bereich (vgl. 5.1.6, Abbildung 45) bzw. der linken globulären Hälfte in Abbildung

36 entspricht, und GST A4 aa 82 bis 222, das dem C-terminalen Bereich bzw. der rechten globulären Hälfte in Abbildung 36 entspricht, gewählt. In dem Bereich zwischen diesen beiden Hälften liegen Aminosäuren, die für die Dimerisierung von GST A4 wichtig sind (vgl. 5.1.9) und auch vermutlich bei der Ligandinfunktion (vgl. 5.1.10) eine Rolle spielen. Als dritter Bereich GST A4 aa 42 bis 112 wurde ein im Vergleich zum N-terminalen Fragment vergrößerter Bereich gewählt, der den Bereich des C-Terminus enthält, der dem N-Terminus gegenüberliegt (nämlich die gesamte $\alpha 4$ Helix, vgl. 5.1.6, Abbildung 45). Abbildung 37 zeigt die hypothetische Struktur der gewählten Fragmente im Kontext des B1-1 Proteins.

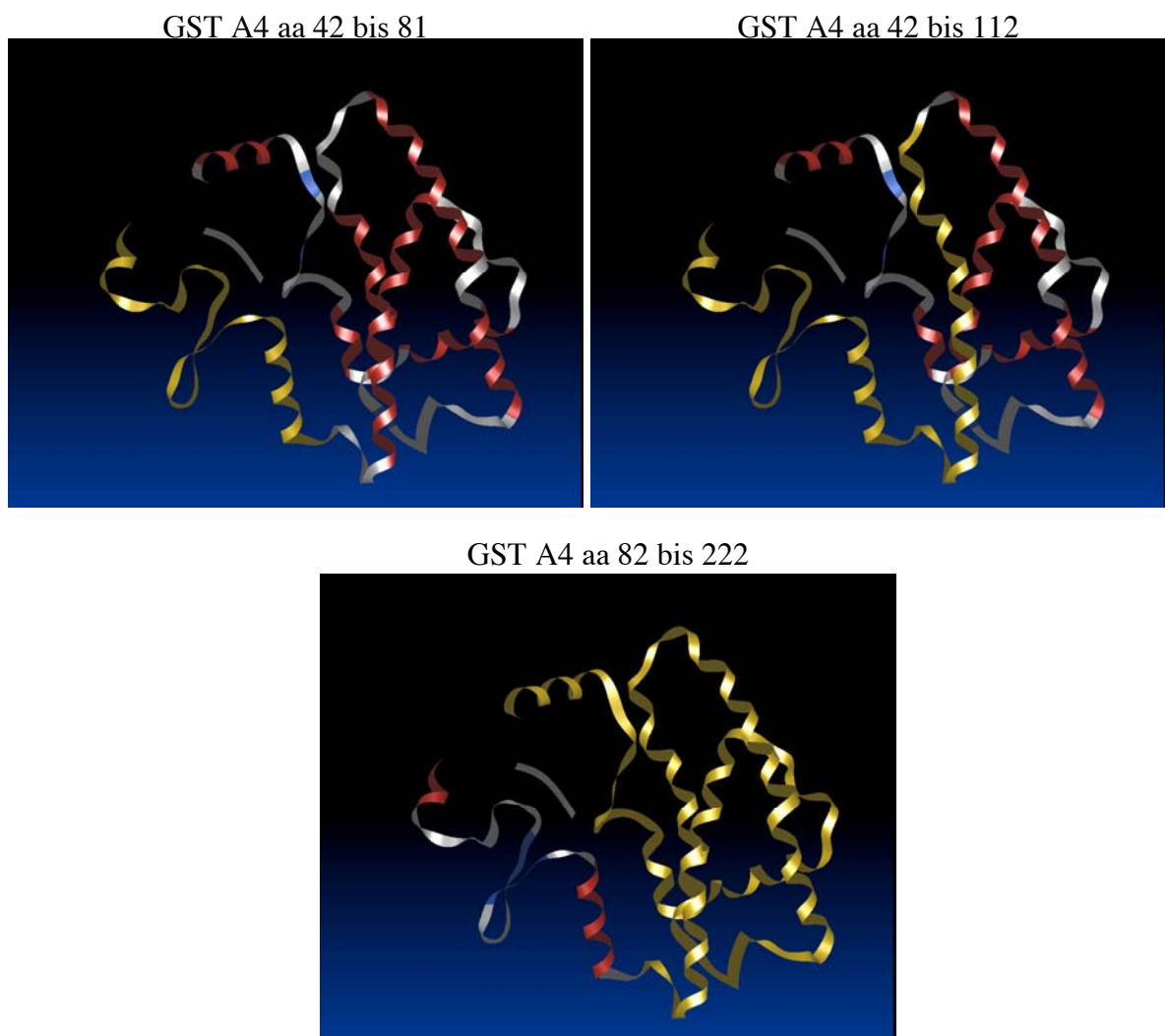


Abbildung 37: Illustration der Fragmente von GST A4, die auf Interaktion mit Rev getestet wurden. Die Strukturen wurden dargestellt mit dem Programm iMol und basieren auf der PDB Datei 1GUL, wobei die ersten 41 Aminosäuren von GST A4 herausgelöscht wurden (vgl. Abbildung 36). Dargestellt ist jeweils die gesamte hypothetische B1-1 Struktur; die bezeichneten Aminosäurebereiche, die den konstruierten Fragmenten entsprechen, sind gelb dargestellt.

Das Resultat des Tests auf Interaktion dieser drei Bereiche von GST A4 mit Rev mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems war, daß keiner dieser Bereiche alleine mit Rev interagieren kann, siehe 3.2.1.3. Dieses Ergebnis ist für alle Fragmente eindeutig, und es gibt für keinen dieser Bereiche eine zumindest mäßige Reporteraktivierung, die darauf hindeuten würde, daß einem Fragment für die Interaktion mit Rev besonders wichtige Bereiche zugeschrieben werden können.

Die Tatsache, daß weder Fragmente von Rev (3.2.1.2) noch Fragmente von B1-1 (3.2.1.3) eine starke Interaktion zwischen Rev und B1-1 ermöglichen, unterstützt die Hypothese, daß Rev an mehreren Stellen Kontakte mit B1-1 eingeht. Rev würde auf diese Weise wahrscheinlich in seiner gesamten Struktur stabilisiert. Daher könnte vermutlich Rev zusammen mit B1-1 co-kristallisiert werden. So werden Glutathion-S-Transferasen in der Kristallographie verwendet, um durch Co-Kristallisation Strukturen von Proteinen aufzuklären, die sich alleine nicht kristallisieren lassen (Lim et al. 1994), vgl. 5.1.2.

4.4.1.3 Zur Untersuchung der Fähigkeit von B1-1 zur Bildung von Heterodimeren mit GST A4

GST A4 kann Dimere bilden (vgl. 5.1.9), und zwar Homodimere oder Heterodimere mit einem anderen Vertreter der α -Klasse GSTs, wie GST A1 (Armstrong 1997). Daher stellt sich die Frage, ob auch B1-1 in der Lage ist, Dimere zu bilden. Dies ist besonders interessant, wenn B1-1 in therapeutischer Absicht eingesetzt werden sollte, da die Möglichkeit besteht, daß es mit endogen in humanen Zellen vorhandenem GST A4 Heterodimere bilden könnte. Diese B1-1/GST A4 Heterodimere würden sich vermutlich anders verhalten als natürlich in den Zellen vorkommende GST A4 Dimere. So könnte B1-1 eventuell endogene GST A4 Moleküle wegfangen und die normale Funktion von GST A4 beeinträchtigen.

Die in 3.2.1.5 erhaltenen Ergebnisse zeigen jedoch, daß die Interaktionsstärke von GST A4 mit einem weiteren Molekül GST A4 im bakteriellen Zwei-Hybrid-System ca. doppelt so groß ist wie die Interaktionsstärke mit einem B1-1 Molekül, siehe Abbildung 27. B1-1 hat aber eine sehr viel stärkere Tendenz, Rev-Moleküle zu binden – die Interaktionsstärke B1-1/Rev ist ca. zehnfach größer als die Interaktionsstärke B1-1/GST A4. Das bedeutet, daß therapeutisch in humane Zellen eingebrachte B1-1 Moleküle eher Rev-Moleküle als endogenes GST A4 binden würden – unter der Voraussetzung, daß die Interaktionsstärken in humanen

Zellen sich ähnlich wie in bakteriellen Zellen verhalten. Falls aber doch endogene GST A4 Moleküle durch B1-1 gebunden würden und dadurch deren Funktion beeinträchtigt würde, könnte dieser Verlust vermutlich einerseits durch verstärkte Expression des GST A4 Gens ausgeglichen werden, da die Expression von GST A4 bei Bedarf gesteigert werden kann, siehe z.B. Velichkova und Hasson (2005) und vgl. 5.1.3. Andererseits könnten wahrscheinlich andere Glutathion-S-Transferasen teilweise die Funktion von GST A4 übernehmen, da Glutathion-S-Transferasen überlappende Substratspezifitäten haben, was sich auch in GST A4 knockout Mäusen zeigte, siehe z.B. Hayes et al. (2005). (Diese GST A4 knockout Mäuse sind phänotypisch weitgehend unauffällig, sind aber im Vergleich zu *wildtyp* Mäusen anfälliger für bakterielle Infektionen und beeinträchtigt im Schutz der Zelle z.B. gegen starken oxidativen Streß, siehe z.B. Engle et al. (2004); Dwivedi et al. (2006).)

Das Ergebnis, daß B1-1 nur eine relativ schwache Tendenz hat, GST A4 Moleküle zu binden, kann auch aus der Struktur des Dimer-Interfaces abgeleitet werden, vgl. 5.1.9. So ist zwar Phe52, das eine sehr wichtige Rolle bei der Ausbildung eines Dimers spielt, in B1-1 präsent. Es fehlen aber eine Reihe der das Dimer stabilisierender Aminosäuren, wie Tyr9, Arg15 und vor allem Trp20, vgl. 5.1.9.

4.4.2 B2-92 und VPS 28

Als zweiter neuer Rev-interagierender Faktor wurde beim Screening einer humanen cDNA-Bibliothek aus fötalem Gehirn B2-92 entdeckt (siehe Ergebnisse 3.1.3). Das zu B2-92 gehörende Protein voller Länge ist Vacuolar Protein Sorting 28 (VPS 28). B2-92 entspricht den Aminosäuren 17 bis 222 von VPS 28. Im Anhang sind Informationen aus Literatur und Internetdatenbanken zu VPS 28 zusammengestellt (siehe 5.2).

Das Protein VPS 28 ist Teil des ESCRT-I Komplexes, siehe z.B. Kostelansky et al. (2006), der v.a. am Transport ubiquitiniertes Proteine in das Endosom beteiligt ist, vgl. 5.2. Zu dieser bei Eukaryonten sehr konservierten Transportmaschinerie gehören die Proteinkomplexe ESCRT-I, -II und -III, die sequentiell miteinander interagieren, sowie weitere akzessorische Proteine, siehe z.B. Slagsvold et al. (2006). Die ESCRT-Komplexe spielen ebenfalls eine wichtige Rolle beim Abknospen (Budding) einiger Viren, darunter HIV, aus infizierten Zellen, siehe z.B. Pornillos et al. (2002b), vgl. 5.2.5.

4.4.2.1 Interaktion von B2-92 und VPS 28 mit Rev

Die in 3.2.1.1 erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß sowohl B2-92 als auch das zugehörige Protein voller Länge VPS 28 im bakteriellen Zwei-Hybrid-System mit Rev interagieren (siehe Abbildung 20). Dabei ist die im β -Galactosidase-Assay gemessene Interaktionsstärke von VPS 28 mit Rev etwas geringer (siehe Abbildung 26 – ca. 70 %) als die von B2-92 mit Rev. Im direkten Vergleich interagiert B2-92 stärker mit Rev als Rev mit sich selbst, siehe Abbildung 18.

Die im bakteriellen System erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der Interaktion von B2-92 und VPS 28 mit Rev konnten auch im humanen System mit HeLa Zellen bestätigt werden. So co-lokalisieren sowohl B2-92 als auch VPS 28 mit Rev (siehe 3.2.2.1), und beide Faktoren können jeweils zusammen mit Rev bei der Co-Immunopräzipitation gefällt werden (siehe 3.2.2.2).

Auf diese Weise konnte für B2-92 und VPS 28 in mehreren Systemen unabhängig voneinander die Interaktion mit Rev gezeigt werden. Die Interaktion ist also auch für diese Faktoren nicht nur in bakteriellen und menschlichen Zellen bestätigt worden, sondern auch durch qualitativ unterschiedliche Methoden: im bakteriellen Zwei-Hybrid-System als genetisches System, mit der Co-Immunopräzipitation als biochemisches System und mit der Co-Lokalisation als mikroskopisches *in-vivo* System.

4.4.2.2 Zur Untersuchung der Interaktion verschiedener Domänen von VPS 28 mit Rev

Um die mit Rev interagierenden Domänen in VPS 28 genauer einzugrenzen wurden insgesamt drei Fragmente von VPS 28 erzeugt (siehe Abbildung 25; diese Fragmente sind in Abbildung 55 in die Primärstruktur eingezeichnet, vgl. 5.2.6). Das N-terminale Fragment, in Abbildung 55 blau dargestellt, entspricht dem N-terminalen Teil von VPS 28, der an der Bildung des ESCRT-I Core beteiligt ist, vgl. 5.2.3. Der grün markierte Teil entspricht dem C-terminalen Teil von VPS 28, der in seiner Struktur flexibel ist, aus dem ESCRT-I Core herausragt und den ESCRT-II Komplex kontaktiert, vgl. 5.2.3. Der mittlere Teil, der in Abbildung 55 rot markiert ist, verbindet beide Hälften. Bei der Wahl der Fragmente wurden Sekundärstrukturen, sofern sie bekannt sind, und konservierte Bereiche berücksichtigt.

Mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems wurden diese drei Bereiche von VPS 28 jeweils auf Interaktion mit Rev getestet, siehe 3.2.1.4, und die Interaktionsstärken mittels des β -Galactosidase-Assays quantifiziert. Als Referenz für die Interaktionen mit Rev wurden ebenfalls B2-92 und VPS 28 untersucht. Von den getesteten VPS 28 Fragmenten zeigte nur das N-terminale Fragment VPS 28 aa 2 - 123 eine Interaktion mit Rev, die sogar in ihrer Interaktionsstärke mit ca. 130 % deutlich über der Stärke der Interaktion von B2-92 mit Rev lag. Des weiteren erreichte VPS 28 nur knapp 70 % der Interaktionsstärke von B2-92, dem im Vergleich zu VPS 28 die ersten 16 Aminosäuren fehlen, mit Rev. Daraus kann geschlossen werden, daß die ersten Aminosäuren des N-Terminus nicht an der Interaktion mit Rev beteiligt sind, sondern diese eher etwas beeinträchtigen. In zukünftigen Experimenten kann daher versucht werden den Rev-interagierenden Bereich im N-Terminus weiter einzugrenzen.

Rev kontaktiert also VPS 28 in dem Bereich, der normalerweise VPS 37 und VPS 23, die anderen Untereinheiten des ESCRT-I Komplexes, bindet, siehe z.B. Kostelansky et al. (2006), vgl. 5.2.3 und 5.2.4. Dieses Ergebnis kann in zweifacher Hinsicht diskutiert werden: 1. die mögliche Bedeutung der Interaktion von VPS 28 mit Rev in einer HIV-infizierten Zelle; 2. die mögliche therapeutische Bedeutung von VPS 28 Fragmenten.

4.4.2.2.1 Mögliche Bedeutung der Interaktion zwischen VPS 28 und Rev in einer HIV-infizierten Zelle

Das VPS 28 Protein kann nicht nur in Bakterien mit Rev interagieren (siehe 3.2.1.1 und 3.2.1.4), sondern auch in humanen Zellen (siehe 3.2.2). Es stellt sich also die Frage, ob diese Interaktion in HIV-infizierten Zellen von Bedeutung ist. Wahrscheinlich wird VPS 28 in Zellen, die normalerweise von HIV infiziert werden, wie T-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen usw., exprimiert. So wird VPS 28 auch in Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Milz und Thymus exprimiert, vgl. Expressionsprofil von VPS 28 in Abbildung 56, 5.2.6. Zytoplasmatisches Rev wird in der infizierten Zelle also vermutlich von VPS 28 gebunden. Die möglichen Konsequenzen sind in Abbildung 38 schematisch dargestellt und werden im folgenden erläutert.

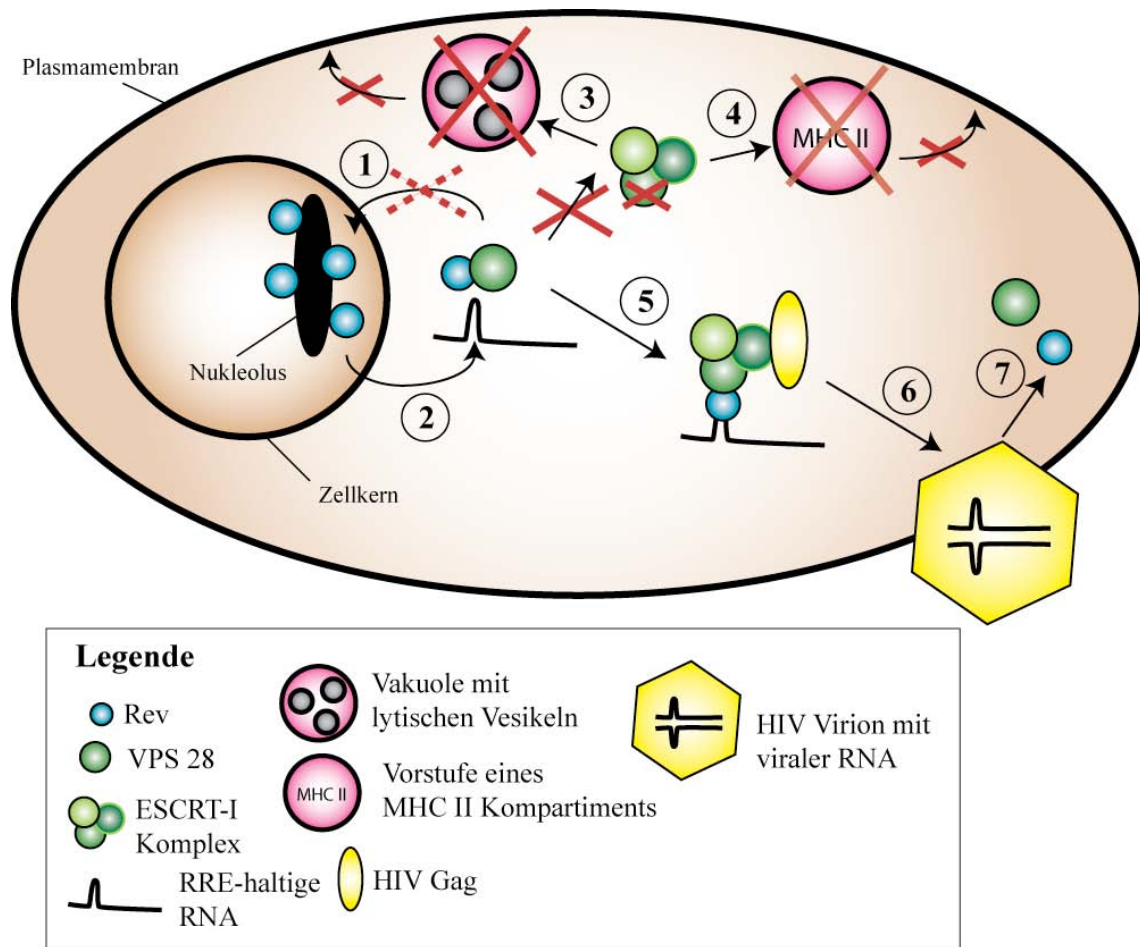


Abbildung 38: Mögliche Konsequenzen der Interaktion zwischen Rev und VPS 28. 1: Rev, das nach der Synthese oder nach dem Export aus dem Zellkern im Zytoplasma vorliegt, wird von VPS 28 gebunden. Ein Teil der Rev-Moleküle wird auf diese Weise eventuell sequestriert. Möglicherweise ist die Bindung zwischen VPS 28 und Rev aber nicht stark genug, um den Transport einiger Rev-Moleküle in den Zellkern zu verhindern. 2: Dann wird Rev RRE-haltige virale RNA aus dem Zellkern exportieren. Die Interaktion mit Rev wird möglicherweise bewirken, daß VPS 28 nicht mehr in den ESCRT-I Komplex integrieren kann. Ein nicht funktioneller ESCRT-I Komplex hätte vor allem in T-Zellen zur Folge, daß die Bildung von Vakuolen mit lytischen Vesikeln (3) und die Bildung der Vorstufen von MHC Klasse II Kompartimenten (4) beeinträchtigt wäre; 5: falls die Bindung von Rev aber nicht die Fähigkeit von VPS 28 behindert, die anderen Komponenten des ESCRT-I Komplex zu kontaktieren, würde der ESCRT-I Komplex über VPS 28 Rev Moleküle gebunden haben, die wiederum RRE-haltige virale RNA gebunden haben – gleichzeitig würde über die VPS 23 Untereinheit von ESCRT-I HIV Gag Protein gebunden werden; 6: das würde dazu führen, daß sich das HIV-Partikel mit Hilfe der ESCRT-Maschinerie an der Plasmamembran zusammensetzen kann und Rev dabei die virale RNA in das Viruspartikel bringt („Assembly-Hypothese“); 7: vor dem endgültigen Assembly und Abknospen des Virus werden die Komponenten der ESCRT-Maschinerie und Rev abgelöst.

In vielen Zelltypen ist die Gleichgewichts-Lokalisation von Rev nukleär/nukleolär (siehe 1.2.1), wohingegen VPS 28 in der gesamten Zelle lokalisiert ist und der Nukleolus eher ausgespart bleibt (siehe Abbildung 28, H). Daher wird zunächst vermutlich nur ein kleiner Anteil der in der Zelle vorliegenden Rev-Moleküle

durch VPS 28 gebunden. Möglicherweise wird ein Teil dieser Rev-Moleküle durch VPS 28 sequestriert und so von einem Shuttling zurück in den Kern bzw. Nukleolus abgehalten. Rev hat in diesem Moment aber seine Funktion schon erfüllt und virale RRE-haltige mRNAs aus dem Kern transportiert, siehe 1.2.1. Daher wird der durch Sequestrierung durch VPS 28 verursachte Verlust an Rev-Molekülen aus der Sicht des Virus wahrscheinlich vernachlässigbar sein, zumal der größte Anteil der Rev-Moleküle sich im Nukleolus befindet (siehe Abbildung 28, I). Andererseits wird durch die Bindung von Rev vermutlich auch die normale Funktion von VPS 28 beeinträchtigt, d.h. das Assembly im ESCRT-I Komplex und die Kontaktierung von ESCRT-II über VPS 28, siehe z.B. Kostelansky et al. (2006), vgl. 5.2.3. Dies wird aber wahrscheinlich für die Zelle keinen gravierenden Nachteil bedeuten, da ein Teil der VPS 28 Moleküle vermutlich ihre normale Funktion als Teil der ESCRT-Maschinerie erfüllen kann (vgl. 5.2.2) und andererseits ein gewisser Verlust des ESCRT-I Komplexes durch den ESCRT-II Komplex ausgeglichen werden kann, siehe 4.4.2.2 und Langelier et al. (2006); Slagsvold et al. (2006). Möglicherweise erfüllt eine gewisse Blockierung der ESCRT-Maschinerie aber auch für HIV positive Funktionen. Die ESCRT-Komplexe sind unter anderem an der Bildung von MVBs (multivesicular bodies) beteiligt, die in T-Zellen als Vorstufen für lytische Vesikel fungieren und in Antigen-präsentierenden Zellen als Vorstufen von MHC Klasse II Kompartimenten, siehe z.B. Raiborg et al. (2003), vgl. 5.2.1. So würde eine infizierte T-Zelle Funktionen im Immunsystem nicht mehr erfüllen können.

Es ist bekannt, daß der ESCRT-I Komplex essentiell für das Ausknospen (Budding) intakter HI-Viren ist, vgl. 5.2.5, Pornillos et al. (2002b); Martin-Serrano et al. (2003b). In diesem Zusammenhang kann über eine mögliche Bedeutung der Interaktion zwischen Rev und VPS 28 nachgedacht werden. Falls diese Interaktion prinzipiell nachteilig für HIV wäre, würde sie sich wahrscheinlich nicht in der Evolution herausgebildet haben. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Interaktion zwischen Rev und HIV entweder für die HIV-Replikation ohne deutlich negative Bedeutung ist oder aber sogar von Vorteil. Eventuell spielt die Rev - VPS 28 Interaktion sogar eine wichtige Rolle im Replikationszyklus von HIV. So ist bekannt, daß ubiquitinierte Gag-Proteine mit der ESCRT-Maschinerie interagieren und auf diese Weise Viren aus der Membran ausknospen, siehe z.B. Pornillos et al. (2002a); Clague und Urbe (2003), vgl. 5.2.5. Interessant ist in diesem Zusammenhang die kürzlich gemachte Entdeckung, daß auch Rev ubiquitiniert werden kann (Vitte et al. 2006). Die Rev - VPS 28 Interaktion könnte eventuell dafür sorgen, daß über die Interaktion mit Rev gebundene virale genomische RNA an

die Membran gebracht wird. Auf diese Weise könnte die genomische RNA in das Virion beim Assembly an der Zellmembran gebracht werden. Bisher ist unbekannt, wie die genomische RNA in das Virion gelangt, siehe z.B. Cimarelli und Darlix (2002). Über die Interaktion mit Rev und VPS 28, das essentiell für das Budding ist (Martin-Serrano et al. 2003b) wäre dies denkbar („Assembly-Hypothese“). Allerdings wurden in Virion Partikeln keine Rev-Moleküle gefunden. Das widerspricht aber der Assembly-Hypothese nicht. So gelangt auch beim Sorting ubiquitiniertes Protein durch die ESCRT-Maschinerie Ubiquitin und die Komponenten der ESCRT-Maschinerie nicht mit ins Vesikel, sondern werden vorher abgelöst, siehe Dupre und Haguenaer-Tsapis (2001); McCullough et al. (2006), vgl. 5.2.3. Auf ähnliche Weise könnte Rev vor dem endgültigen Virus-Assembly mit den übrigen Komponenten der ESCRT-Maschinerie abgetrennt werden und daher nicht mit ins Virion gelangen.

Die Assembly-Hypothese ist jedoch zu diesem Zeitpunkt spekulativ und muß durch entsprechende Experimente überprüft werden.

4.4.2.2 Mögliche therapeutische Bedeutung von VPS 28 Fragmenten

Wie in 4.4.2.1 ausgeführt, könnte die Interaktion zwischen Rev und VPS 28 auch für die Virus-Replikation positive Aspekte haben. So würde aus der Sicht des Virus der Nachteil der Sequestrierung von Rev-Molekülen ausgeglichen durch positive Aspekte, wie die Assembly-Hypothese. Für Fragmente von VPS 28, die Rev deutlich stärker binden als *wildtyp* VPS 28 wie das N-terminale Fragment von VPS 28 (gezeigt im bakteriellen Zwei-Hybrid-System, siehe 3.2.1.4), wäre dies höchstwahrscheinlich nicht der Fall. Durch eine viel stärkere Bindung von Rev würde die Sequestrierung von Rev-Molekülen viel mehr Gewicht bekommen. Ein N-terminales Fragment von VPS 28, das Rev stark bindet, könnte wahrscheinlich nicht in den ESCRT-I Komplex integrieren. Falls doch, könnte jedenfalls der Kontakt zum ESCRT-II Komplex nicht hergestellt werden, da dieser über die C-terminale Hälfte von VPS 28 erfolgt (Kostelansky et al. 2006), vgl. 5.2.3. ESCRT-I kann über die C-terminale Domäne von VPS 28 auch direkte Kontakte zu ESCRT-III herstellen (Pineda-Molina et al. 2006). Ein ESCRT-I Komplex, der ein N-terminales Fragment von VPS 28 beinhaltet, könnte also keine Kontakte zu ESCRT-II oder ESCRT-III herstellen. Letzterer ist aber essentiell zur Einfaltung der Membran und Abknospung (Slagsvold et al. 2006), vgl. 5.2.3 und 5.2.5. Ein ESCRT-I Komplex, der ein N-terminales Fragment von VPS 28 beinhaltet, würde aber nach wie vor

über die Untereinheit VPS 23 (=TSG101) HIV Gag-Moleküle binden (Pornillos et al. 2002a). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß Fragmente von VPS 23 (= Tsg101) sich transdominant negativ auf das Budding von HIV auswirken, siehe Martin-Serrano et al. (2003b).

Ein VPS 28 Fragment würde auf diese Weise gleich zwei antivirale Funktionen besitzen: zum einen würde es Rev stark binden, und somit vor der Erfüllung seiner Funktion sequestrieren; zum anderen würde das Virus-Budding verhindert, siehe Abbildung 39. Ein VPS 28 Fragment wäre somit das erste antivirale Agens, das gleichzeitig zwei unterschiedliche Prozesse in der Virus-Replikation blockiert. Die Entwicklung resistenter Viren wäre daher außerordentlich erschwert.

Dabei stellt sich aber die Frage, ob ein Fragment von VPS 28 nicht das normale Sorting von Proteinen in Vesikel durch die ESCRT-Maschinerie (vgl. 5.2.2) beeinträchtigen würde und somit eine gewisse Toxizität auf die Zelle ausüben würde. Diese Frage kann letztendlich nur durch entsprechende Toxizitäts-Untersuchungen geklärt werden. Es muß jedoch folgendes beachtet werden:

HIV ist für das Budding auf ESCRT-I angewiesen (Martin-Serrano et al. 2003b), vgl. 5.2.5. Andererseits wird ESCRT-II für das Budding nicht benötigt (Langelier et al. 2006).

Genau umgekehrt ist die Situation aus der Sicht der Zelle. Hier scheint ESCRT-I nicht unbedingt nötig zu sein – ESCRT-II kann teilweise die Funktion von ausgefallenem ESCRT-I Komplex (knockout in Maus) übernehmen (Slagsvold et al. 2006). Weiterhin ist ESCRT-I nicht nötig, um ESCRT-II an die Membran zu dirigieren, da die GLUE-Domäne von VPS 36 in ESCRT-II ebenfalls die Fähigkeit besitzt, bestimmte Membranlipide zu binden (Babst et al. 2002; Slagsvold et al. 2005), vgl. 5.2.3. Außerdem zeigte knockout von VPS 28 in *Drosophila* nur moderate Auswirkungen auf die MVB (multivesicular body) Morphologie und hat die Herunterregulierung verschiedener Zelloberflächenrezeptoren nicht meßbar beeinflußt (Sevrioukov et al. 2005). Des weiteren gibt es auch eine Reihe von Zelloberflächenrezeptoren, die unabhängig vom ESCRT-I Komplex über den MVB pathway herunterreguliert werden (Gullapalli et al. 2006). Nach einem Modell von Langelier et al. (2006) fungieren ESCRT-I und ESCRT-II hauptsächlich als Adapter, die dazu beitragen, entsprechende Cargo-Moleküle dem MVB pathway zuzuführen, wohingegen der ESCRT-III Komplex und VPS 4 direkt an der Bildung von Vesikeln beteiligt sind (vgl. 5.2.5).

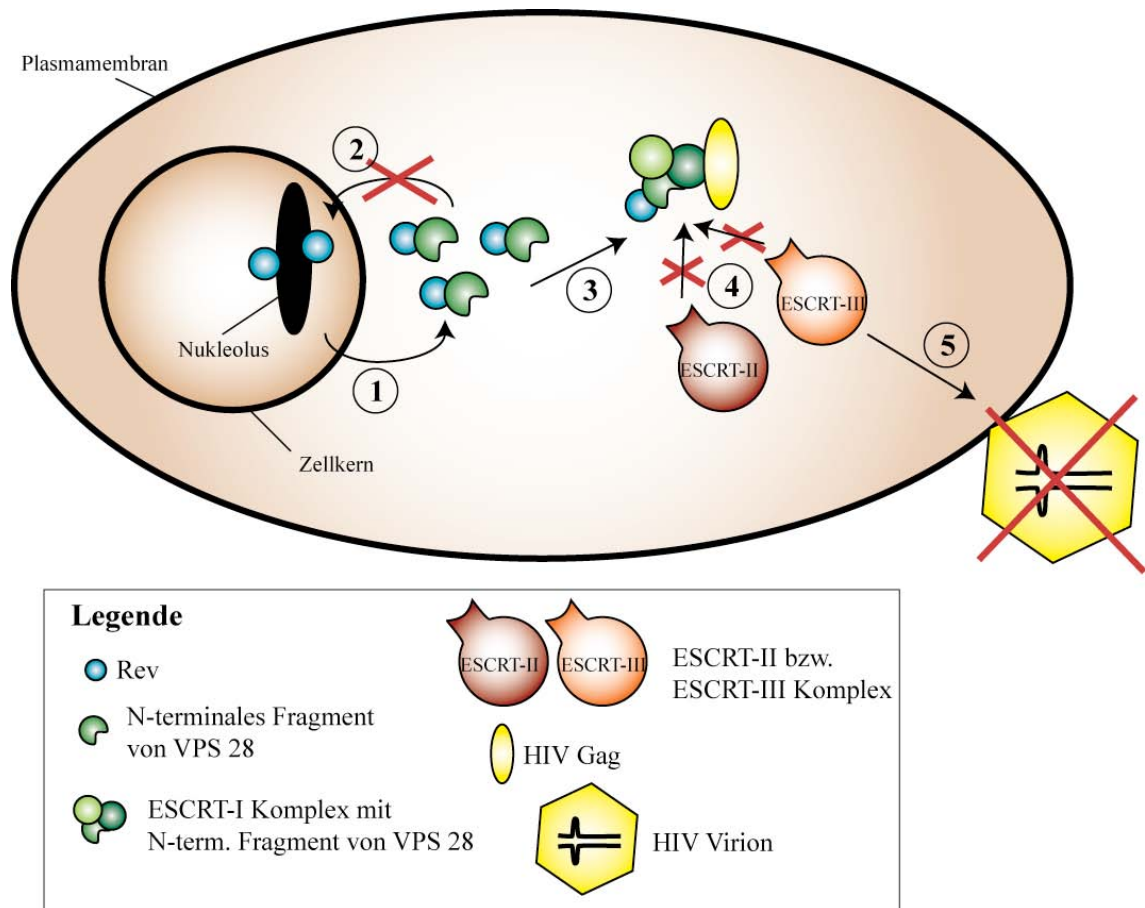


Abbildung 39 Mögliche Konsequenzen der Interaktion zwischen Rev und einem N-terminalen Fragment von VPS 28 („Nt-VPS 28“). Wenn die Interaktion zwischen Rev und Nt-VPS 28 viel stärker ist als mit *wildtyp* VPS 28 hätte das zur Folge, daß jedes Rev-Molekül, das im Zytoplasma auftaucht, durch Nt-VPS 28 sequestriert wird (1) und so von einem shuttling zurück in den Zellkern abgehalten wird (2). Falls Nt-VPS 28 in den ESCRT-I Komplex integrieren kann, wird dieser Komplex zwar Rev und Gag binden (3), aber aufgrund des Fehlens des C-Terminus von VPS 28 keine Kontakte zum ESCRT-II oder ESCRT-III Komplex herstellen können (4); diese sind aber essentiell für ein Assembly von HIV an der Plasmamembran – dieses Assembly und damit auch das Budding von HIV wären somit verhindert (5).

ESCRT-I ist also für das Budding von HIV essentiell, nicht aber für das Sorting ubiquitinerter Proteine in Vesikel in Zellen. Blockierung von ESCRT-I durch ein Fragment von VPS 28 würde daher in zweifacher Weise, wie oben ausgeführt, antiviral wirken, andererseits vermutlich die Zelle aber nicht deutlich schädigen.

4.4.3 Zytotoxizität von B1-1 und B2-92

Vor einem möglichen zukünftigen therapeutischen Einsatz der in dieser Arbeit neu identifizierten Rev-interagierenden Proteine, ist natürlich eine genaue Abklä-

rung möglicher toxischer Effekte nötig. Generell finden die ersten Zytotoxizitäts-Untersuchungen von neuen Substanzen in der Zellkultur statt und nähern sich der natürlichen Situation immer mehr an, wobei auch der Aufwand der Toxizitätsuntersuchungen steigt. Es ist daher sinnvoll, als ersten Test auf Toxizität eine Untersuchung der generellen Toxizität in einem etablierten Zellkulturmodell durchzuführen. Verschiedene Toxizitäts-Tests messen verschiedene Aspekte der Zytotoxizität, wie z.B. Zellproliferation durch Messung des [³H]Thymidin Einbau bzw. 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) Einlagerung in die DNA (Taylor et al. 1957) oder mitochondrielle Aktivität durch den MTT-Test (Mosmann 1983), siehe unten, oder generelle Zytotoxizität durch den ⁵¹Cr-release Assay (Brunner et al. 1968) oder generelle Zytotoxizität und Membranintegrität durch den LDH-release Assay (Korzeniewski und Callewaert 1983), siehe unten, bzw. durch Aufnahme des Farbstoffs Trypan-Blau. Die beiden am häufigsten angewendeten Zytotoxizitätstests sind der MTT-Test und der LDH-release Assay (Abe und Matsuki 2000).

Beim MTT-Assay wird die Umwandlung von MTT in das violette MTT-Formazan gemessen, die durch die Redoxaktivität in lebenden Zellen stattfindet. Eine Verminderung dieser MTT-Reduktion deutet auf eine Zellschädigung hin. Beim LDH-release Assay wird die Freisetzung des intrazellulären Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) gemessen, die bei Schädigung der Zellmembran auftritt. Der LDH-release Assay ist ein guter Test für Schädigung der Zelle oder Zelltod (Kendig und Tarloff 2007; Legrand et al. 1992; Abe und Matsuki 2000). York et al. (1998) haben untersucht, daß Glutathion-S-Transferasen MTT *in vitro* reduzieren können und so im MTT-Assay zu starken Hintergrund-Schwankungen führen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der LDH-release Assay verwendet, der eine gute Alternative zum MTT-Test darstellt.

Die Toxizitätsuntersuchungen wurden mit Hilfe des LDH-release Assays Cyto-ToxONE von Promega in HeLa Zellen durchgeführt, wobei die neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren transient transfiziert wurden, siehe 3.2.2.3. HeLa-Zellen wurden gewählt, weil sie sich leicht transfizieren lassen und diese Zellen auch in den anderen Experimenten als Modell für humane Zellen verwendet wurden, siehe 3.2.2. Da sich HeLa-Zellen jedoch relativ schnell teilen, war der Zeitraum von der Transfektion bis zur Durchführung des Zytotoxizitätstests auf maximal 48 Stunden begrenzt. Die Toxizitätsmessungen wurden daher nach 24 bzw. 48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Mengen an Plasmid transfiziert (10 ng bis 100 ng pro Loch einer 96-Loch-Platte), so daß ein weiter Bereich an unterschiedlichen DNA-Mengen transfiziert wurde. Nach Empfehlungen der Firma Roche zum Transfektionsreagenz FuGENE liegt der

Bereich der DNA-Masse für Transfektionsexperimente im 96-Loch-Format bei 30 ng bis 60 ng. Die Transfektionseffizienz wurde mikroskopisch anhand der Expression von GFP-fusionierten Proteinen überprüft, da die geringe Anzahl an Zellen im 96-Loch-Format keine anderweitige Bestimmung der Transfektionseffizienz, z.B. durch Westernblot oder FACS-Analysen, zuläßt. Die Transfektionseffizienz lag zwischen ca. 38 % und ca. 66 %, nahm generell mit steigender transfizierter DNA-Menge zu und entspricht damit den für HeLa-Zellen im 96-Loch-Format zu erwartenden Werten. Für die Toxizitätsuntersuchungen wurden die Faktoren B1-1 bzw. B2-92 jeweils einzeln oder in Kombination mit Rev transfiziert, wobei dann das Plasmid, das für Rev codiert, in gleicher Masse (und damit nahezu äquimolar) wie das Plasmid, das für den Faktor B1-1 bzw. B2-92 codiert, eingesetzt wurde. Der Grund für die Toxizitätsuntersuchung der Faktoren B1-1 und B2-92 in Kombination mit Rev liegt darin, daß B1-1 und B2-92 in Gegenwart von Rev eine veränderte Lokalisation zeigen, siehe 3.2.2.1. So sind B1-1 und B2-92 nur in Gegenwart von Rev im Nukleolus anzutreffen. Eine Blockierung des Nukleolus als Bildungsort der Vorstufen der Ribosomen könnte toxische Effekte auf die Zelle ausüben.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen zeigten, daß die transient transfizierten Faktoren unter den oben beschriebenen Bedingungen keine Zytotoxizität ausübten, siehe 3.2.2.3. Dies gilt für alle bei den Transfektionen eingesetzten DNA Mengen (10 ng, 50 ng und 100 ng), die beiden Zeitpunkte der Toxizitätsuntersuchungen nach der Transfektion (24 Stunden und 48 Stunden) und sowohl für die An- als auch Abwesenheit von Rev. Die Toxizität des Rev-Proteins selbst wurde auf gleiche Weise untersucht. Hier ergab sich ebenfalls keine meßbare Toxizität. Dieses Ergebnis mag zunächst ungewöhnlich erscheinen, da bekannt ist, daß das HIV Rev-Protein eine gewisse Toxizität besitzt, siehe z.B. Nosaka et al. (1993). Diese Toxizität von Rev wird jedoch von Miyazaki et al. (1996) und Nosaka et al. (1993) so erklärt, daß Rev im Nukleolus lokalisiert ist, dort die Morphologie des Nukleolus verändert und vermutlich den Transport der Ribosomen-Vorstufen aus dem Zellkern verhindert bzw. verlangsamt. Das führt zu einer Verlangsamung beim Durchlaufen der Mitose. Es ist möglich, daß, solange die Zelle dabei am Leben bleibt, dabei keine Schädigung der Plasmamembran auftritt, die mit dem LDH-release Assay meßbar wäre. Falls diese Blockierung des Nukleolus aber doch zum Tod der Zelle führen sollte und demzufolge die Integrität der Zellmembran nicht mehr gewährleistet wäre, so würde dies erst nach langer Zeit eintreten und der Beobachtungszeitraum von 48 Stunden zu kurz sein, um den Tod der Zelle im LDH-release Assay messen zu können.

Die Faktoren B1-1 und B2-92 sind also frei von Toxizität, die schnell zu einer deutlichen Schädigung oder zum Tod der bei diesem Experiment verwendeten HeLa-Zellen führen würde. Dies ist nicht überraschend, da es sich bei beiden Faktoren selbst um humane Proteine handelt, die ubiquitär exprimiert werden, und eine Toxizität im Gegensatz zu z.B. synthetischen chemischen Substanzen viel unwahrscheinlicher ist. Trotzdem war dieser erste Zytotoxizitäts-Test nötig, um zu zeigen, daß eine Überexpression der Faktoren nicht doch zu Zytotoxizität führt. Damit haben beide Faktoren den ersten grundlegenden Zytotoxizitäts-Test bestanden, und in zukünftigen aufwendigeren Experimenten können weitere Aspekte der Toxizität untersucht werden.

4.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei neue Rev-interagierende Proteine, nämlich B1-1 und B2-92, durch Screening einer cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn mit Hilfe eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems identifiziert. B1-1 stammt von dem zellulären Protein Glutathion-S-Transferase A4 (GST A4) ab, wobei in B1-1 die ersten 41 Aminosäuren fehlen. B2-2 stellt das zelluläre Protein Vacuolar Protein Sorting 28 (VPS 28) ohne die ersten 16 Aminosäuren dar. Für B1-1 und B2-92 sowie für das komplette VPS 28 Protein konnte die Interaktion mit Rev sowohl im bakteriellen Zwei-Hybrid-System als auch in humanen HeLa-Zellen durch Co-Lokalisation und Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems konnte darüber hinaus festgestellt werden, daß die Interaktionsstärken von B1-1 und B2-92 mit Rev jeweils größer als die Stärke der Rev-Rev Interaktion sind. Es konnten keine Bereiche innerhalb des Rev-Proteins identifiziert werden, die mit B1-1 oder B2-92 mit mindestens gleicher Stärke interagierten wie das komplette Rev-Protein. Das könnte darauf hindeuten, daß Rev in voller Länge von B1-1 oder B2-92 gebunden wird. Weitere Untersuchungen mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems zeigten, daß nur B1-1, nicht aber GST A4 mit Rev interagiert, und daß B1-1 nicht in kleinere Rev-interagierende Domänen geteilt werden kann. Daraus läßt sich ein Modell ableiten, nach dem Rev B1-1 in voller Länge bindet. Voraussetzung für die Bindung ist das gesamte B1-1 Molekül, wobei die Bindung durch das Vorhandensein der ersten 41 Aminosäuren in GST A4 verhindert wird.

Aus der Literatur ist bekannt, daß GST A4 Dimere bilden kann. Im bakteriellen Zwei-Hybrid-System zeigte sich, daß die Interaktionsstärke eines B1-1/GST A4-

Heterodimers deutlich geringer ist als die des GST A4-Homodimers, und daß die Interaktionsstärke von B1-1 mit Rev um ein Vielfaches höher ist. Das spricht dafür, daß B1-1 eher Rev bindet als mit GST A4 Heterodimere zu bilden, wodurch Rev wahrscheinlich sequestriert würde. Falls diese Ergebnisse zukünftig auch für humane Zellen verifiziert werden können, stellt B1-1 damit einen guten Kandidaten für ein antivirales Agens dar.

VPS 28 ist Bestandteil des ESCRT-I Komplexes, der für das Abknospen der Viren aus den infizierten Zellen essentiell ist. So wäre es möglich, daß über die Interaktion von VPS 28 mit Rev durch Rev gebundene virale genomische RNA in das Virus-Partikel gelangt („Assembly-Hypothese“). Andererseits zeigte sich im bakteriellen Zwei-Hybrid-System, daß das aminoterminalen Fragment von VPS 28 aa 2 - 123 viel stärker mit Rev interagiert als VPS 28 voller Länge. Ein solches aminoterminalen Fragment von VPS 28 könnte einerseits möglicherweise Rev sequestrieren, andererseits wird es aller Voraussicht nach seine normale Funktion im ESCRT-I Komplex nicht erfüllen können und damit auch ein Ausknospen von HIV aus einer infizierten Zelle verhindern. Daher ist ein solches N-terminalen Fragment von VPS 28 ein vielversprechender Kandidat für ein antivirales Agens, das in mehrere Vorgänge der HIV-Replikation eingreifen kann.

Zytotoxizitätsuntersuchungen von B1-1 und B2-92 in humanen HeLa-Zellen mit Hilfe eines Lactat-Dehydrogenase release Assay stellten für beide Faktoren eine Abwesenheit von genereller Toxizität, die schnell zu einer deutlichen Schädigung oder zum Tod der Zelle führen würde, fest.

4.6 Ausblick

Diese Arbeit bildet die Grundlage für eine Reihe möglicher zukünftiger Untersuchungen. Drei wesentliche zukünftige Untersuchungsziele stellen die im folgenden näher erläuterten Punkte dar: 1. Überprüfung der neu identifizierten Rev-interagierenden Proteine oder Fragmente hiervon auf die Fähigkeit, die Replikation von HIV zu inhibieren; 2. Versuch der Co-Kristallisation von Rev mit dem B1-1 Protein und 3. Überprüfung der in dieser Arbeit formulierten Assembly-Hypothese.

1.) In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems gezeigt, daß das N-terminalen Fragment von VPS 28 Rev deutlich stärker bindet als B2-92 (siehe 3.2.1.4). Damit stellt dieses Fragment einen potentiellen Inhibitor der Rev-

Funktion dar, indem es den Zutritt der für die Rev-Funktion notwendigen Faktoren verhindern könnte. Auf diese Weise würde es Rev blockieren und dadurch antivirale Wirkung besitzen. In zukünftigen Experimenten kann daher die antivirale Wirkung dieses Fragments von VPS 28 getestet werden, bzw. versucht werden, weitere Fragmente von VPS 28 (oder auch B1-1) zu konstruieren, die auf ihre antivirale Wirkung hin untersucht werden können. Dabei ist zu berücksichtigen, daß diese Faktoren unter Umständen nicht nur Rev blockieren, sondern zusätzlich weitere Prozesse im HIV-Replikationszyklus inhibieren können. So wäre es z.B. möglich, daß ein N-terminales Fragment von VPS 28 einerseits Rev blockiert und andererseits mit dem HIV budding interferiert (siehe 4.4.2.2.2). Daher muß das antivirale Potential dieser Faktoren mit Experimenten untersucht werden, die Auskunft über die Fähigkeit zur Inhibierung des gesamten HIV-Infektionszyklus geben.

Mögliche Eignung Rev-interagierender Proteine als HIV Therapeutikum:

Proteine können aufgrund ihrer komplexen dreidimensionalen Struktur ihr Ziel (wie z.B. Rev) sehr spezifisch binden und verursachen, wenn sie zellulären Ursprungs sind, mit großer Wahrscheinlichkeit keine Toxizität oder neutralisierende Antikörper. In der modernen HIV Therapie wird mit dem 36 Aminosäuren langen Peptid T20 ein hochwirksamer neuer Wirkstoff aus der Klasse der Proteine/Peptide eingesetzt (siehe 1.3.1). T20 ist außerhalb der Zellen wirksam. Es stellt sich aber die Frage, wie ein Protein oder Peptid, das Rev binden soll, in die Zellen gelangen kann. Hierzu gibt es mehrere Möglichkeiten.

So könnte ein therapeutisch wirkendes Rev-bindendes Protein gentherapeutisch in Zellen eingebracht werden. Die Progression des Krankheitsbildes AIDS ist eng mit dem Titer an CD4-Zellen im Patienten verknüpft, siehe 1.1.3. Daher wäre es eine Möglichkeit, CD4-Zellen oder hämatopoetische Stammzellen aus einem Patienten zu isolieren und mit einem Konstrukt, das für den Rev-interagierenden therapeutischen Faktor codiert, zu transduzieren, um es dann dem Patienten zurückzugeben, vgl. z.B. Woffendin et al. (1996).

Eine weitere Möglichkeit wäre es, das therapeutisch wirksame Protein oder Peptid an eine Protein-Transduktions-Domäne (PTD) zu fusionieren, die es dem Fusionsprotein dann erlaubt, die Plasmamembran zu durchqueren (Console et al. 2003; Wadia und Dowdy 2005). PTDs wurden in mehreren Proteinen entdeckt, die die Plasmamembran durchdringen können, wie z.B. die Antennapedia PTD oder die PTD des HIV Tat Proteins. In den letzten Jahren wurden Protein-Transduktions-Domänen erfolgreich in Zellkultur und Tiermodellen eingesetzt (Wadia und Dowdy 2005).

2.) B1-1, das vom humanen Protein Glutathion-S-Transferase A4 (GST A4) abstammt, bindet das Rev-Protein wahrscheinlich an mehreren Stellen in voller Länge, wie sich aus der Struktur von GST A4 (vgl. 5.1.6) und der Abwesenheit einer starken Interaktion von Fragmenten von GST A4 (siehe 3.2.1.3) oder Rev (siehe 3.2.1.2) schließen läßt (siehe 4.4.1.2). Daher wäre es eventuell möglich, Rev zusammen mit B1-1 zu co-kristallisieren und so die Gesamtstruktur von Rev aufzuklären. Glutathion-S-Transferasen wurden schon öfter benutzt, um Proteine, die zuvor nicht kristallisiert werden konnten, zu co-kristallisieren, vgl. 5.1.2 (Lim et al. 1994).

3.) Es zeigte sich in dieser Arbeit, daß das zum zweiten neu identifizierte Rev-interagierende Faktor B2-92 zugehörige Protein voller Länge Vacuolar Protein Sorting 28 (VPS 28) ebenfalls mit Rev interagieren kann. Das wirft die Frage auf, ob eine Interaktion zwischen Rev und VPS 28 in der infizierten Zelle biologisch von Bedeutung ist, was zur Entwicklung der Assembly-Hypothese (siehe 4.4.2.2.1) führte. Diese Hypothese muß durch entsprechende Experimente überprüft werden.

5 Anhang

5.1 Informationen zur Glutathion-S-Transferase A4 (GST A4) aus Literatur und Internet-Datenbanken

5.1.1 Glutathion-S-Transferasen (GSTs) allgemein

Glutathion-S-Transferasen inaktivieren v.a. toxisch und mutagen wirkende Stoffwechselprodukte, die durch freie Radikale gebildet werden und sind daher ein wichtiger Entgiftungs-Mechanismus in Zellen und Geweben (Bruns et al. 1999). Neben der Konjugation von Substraten mit Glutathion können zytosolische GSTs auch hydrophobe Nicht-Substrat Moleküle kovalent oder nicht kovalent binden. Durch diese Aktivität des GSTs, die sogenannte „Ligandin-Funktion“ werden Fremdstoffe und Hormone transportiert, sequestriert und entsorgt (Hayes et al. 2005).

In ihrer Eigenschaft als Enzyme (EC 2.5.1.18) katalysieren GSTs allgemein den nukleophilen Angriff von reduziertem Glutathion auf unpolare Substanzen, die ein elektrophiles Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Schwefel-Atom besitzen. Dabei wird das Tripeptid Glutathion (Glu-Cys-Gly) über dessen Schwefel-Atom an das elektrophile Toxin konjugiert, wie in Abbildung 40 dargestellt. Die GSH-Konjugate sind löslicher als die ursprünglichen Substrate und können daher leicht aus der Zelle entfernt werden (Armstrong 1997).

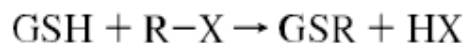


Abbildung 40: Allgemeine Darstellung der Reaktion, die von Glutathion-S-Transferasen katalysiert wird. Glutathion (GSH) wird mit einem elektrophilem Substrat (R-X) konjugiert. Aus Armstrong (1997).

5.1.2 Klassifizierung der Glutathion-S-Transferasen

Es gibt drei große eukaryontische Familien von Enzymen mit Glutathion-S-Transferase-Aktivität: zytosolische, mitochondrielle und mikrosomale GSTs. Die zytosolischen und mitochondriellen GSTs sind beide löslich aber nur entfernt verwandt. Die mikrosomalen GSTs sind Membran-assoziiert und spielen eine Rolle beim Metabolismus der Eicosanoide und des Glutathions. Diese mikrosomalen GSTs sind auch als MAPEG bekannt und strukturell nicht mit den löslichen GSTs verwandt (Hayes et al. 2005).

In der Molekularbiologie findet häufig Sj26GST als Affinitäts-tag Verwendung. Diese Klasse Mu (bzw. μ) GST wird z.B. bei den pGEX Gen-Fusions Systemen benutzt (Kaplan et al. 1997). Ursprünglich stammt diese GST aus dem parasitischen Plathelminthen *Schistosoma japonicum* (Erreger der Schistosomiasis / Bilharziose) und vermag u.a. aufgrund seiner Nicht-

Substrat Ligandin Funktion (s.u.) vom Wirt stammendes Häm zu sequestrieren und damit Häm-induzierten oxidativen Schaden zu vermeiden (Kaplan et al. 1997).

GST-Fusionen werden weiterhin in der Molekularbiologie benutzt, um Peptide oder Proteinfragmente zu co-kristallisieren zur Aufklärung derer Struktur (Lim et al. 1994).

Die zytosolischen GSTs aus Säugern bilden Dimere mit Untereinheiten von jeweils 199 bis 244 Aminosäuren. Aufgrund der Aminosäure-Sequenz können sieben Klassen an zytosolischen GSTs unterschieden werden: Alpha, Mu (μ), Pi, Sigma, Theta, Omega und Zeta. Daneben wurden weitere Klassen in Nicht-Säugern identifiziert. Die Mitglieder innerhalb einer Klasse der zytosolischen GSTs teilen mindestens 40 % identische Aminosäuren – zwischen den Klassen besteht dagegen weniger als 25 % Identität (Hayes et al. 2005).

Es gibt beim Menschen mindestens 16 verschiedene zytosolische GST-Untereinheiten. Die Untereinheiten der Alpha- und Mu-Klasse können Heterodimere bilden, siehe Mannervik und Danielson (1988) und Pettigrew und Colman (2001). GST A5 wurde auf genomischer Ebene identifiziert, eine Expression des Proteins konnte aber nicht nachgewiesen werden (Morel et al. 2002). Die GSTs haben überlappende Substrat-Spezifitäten. Daher ist es schwierig, Isoenzyme nur aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften zu identifizieren (Hayes et al. 2005).

5.1.3 Glutathion-S-Transferase A4 (GST A4): Allgemeines

Hubatsch et al. (1998) identifizierten aus einer humanen fötalen cDNA-Bibliothek aus Gehirn erstmalig die Sequenz, die für GST A4 codiert. Zur Charakterisierung des Proteins wurde GST A4 rekombinant in *E. coli* produziert, nachdem das Codon-usage für starke heterologe Expression humaner Proteine optimiert wurde (vgl. dazu 4.3.2). Ebenso identifizierte Board (1998) die cDNA für GST A4, indem eine BLAST Suche von humanen EST-Sequenzen nach Alpha-Klasse GSTs durchgeführt wurde.

Charakteristisch für die enzymatische Aktivität von GST A4 ist eine hohe katalytische Aktivität mit 4-Hydroxyalkenalen, insbesondere 4-Hydroxynon-2-enal (HNE) (Hubatsch et al. 1998). HNE ist ein wichtiges Produkt des Abbaus von Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren und kann als Biomarker für oxidative Schäden in Geweben benutzt werden (Hubatsch et al. 1998). So ist HNE an vielen pathogenen und degenerativen Prozessen beteiligt, wie z.B. Alzheimer, Arteriosklerose, Katarakt und Krebs (Awasthi et al. 2004). Abbildung 41 illustriert die Rolle der GSTs bei der Beseitigung der oft für die Zelle toxischen Produkte der Oxidation von Fettsäuren.

Diese enzymatische Aktivität von GST A4 unterscheidet sich deutlich von der des verwandten Alpha-Klasse Enzyms GST A1, das keine hohe katalytische Aktivität mit Alkenal-Substraten aufweist (Bruns et al. 1999). Die humane Glutathion-S-Transferase A4 hat mit GST A1 52 % identische Aminosäuren. Die dreidimensionale Struktur beider GSTs ist sehr ähnlich, so daß der Unterschied der Substrat-Spezifität in kleinen Unterschieden der Struktur und unterschiedlicher Chemie der Aminosäure-Seitenketten liegen muß (Bruns et al. 1999).

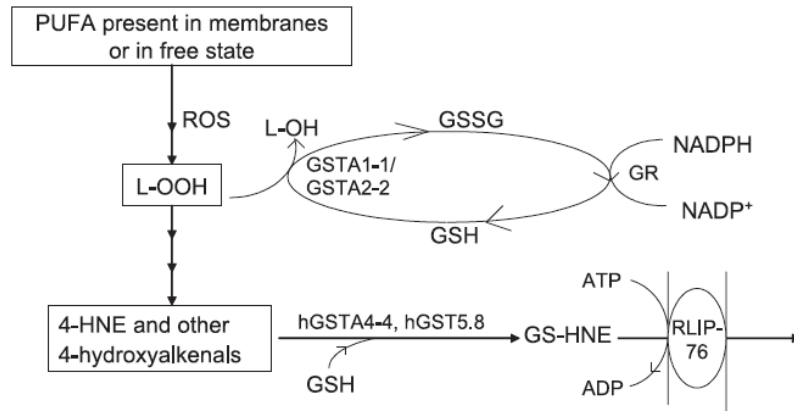


Abbildung 41: Rolle der Glutathion-S-Transferasen A1, A2 und A4 bei der Beseitigung der Produkte der Oxidation von Fettsäuren. GST A4 katalysiert die Konjugation von 4-HNE an Glutathion, das dann durch den ATP-abhängigen Transporter RLIP-76 oder RALBP1 aus den Zellen geschafft wird. GST A1 und A2 greifen schon vor der Bildung von 4-HNE ein, indem sie peroxidierte Fettsäuren (L-OOH) an Glutathion konjugieren, das über NADPH wieder regeneriert wird. (PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäuren; GSH: Glutathion). Aus Awasthi et al. (2004).

Knockout von GST A4 in Maus führt zur Überexpression der Alpha-, Mu- und Pi-Klasse (Hayes et al. 2005), was darauf hindeutet, daß sie in Antwort auf bestimmte chemische Signale in den Zellen induziert werden. Dementsprechend enthalten zytosolische GSTs im Promotor „antioxidant response elements“ (ARE), durch die sie z.B. bei oxidativem Streß transkriptionell aktiviert werden, siehe z.B. Velichkova und Hasson (2005).

5.1.4 Genomische Organisation von GST A4

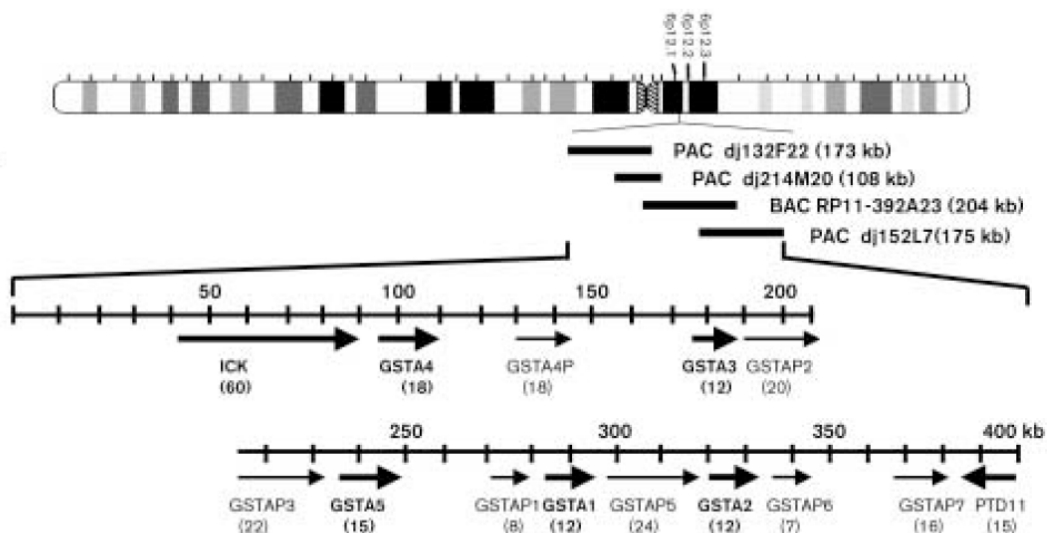


Abbildung 42: Genomische Organisation des humanen GST Alpha Gen clusters auf Chromosom 6p12.1 - p12.2. Dargestellt sind die 5 Gene GST A4, GST A3, GST A5, GST A1 und GST A2 sowie die 7 Pseudogene GST A4P, GST AP2, GST AP3, GST AP1, GST AP5, GST AP6 und GST AP7. Die Größen der Gene und Pseudogene in kb sind in Klammern angegeben. Aus Morel et al. (2002).

Die GST Alpha-Klasse ist genomisch als cluster organisiert und beim Menschen auf Chromosom 6 (p12) lokalisiert. Dieser cluster besteht aus den 5 Genen hGSTA1, hGSTA2, hGSTA3, hGSTA4 und hGSTA5. Außerdem existieren 7 Pseudogene, die als solche durch Deletionen einzelner Basen und/oder ganzer Exons gekennzeichnet sind (Morel et al. 2002), siehe Abbildung 42.

Die Sequenzen der Gene der GST Alpha-Klasse sind in Abbildung 43 dargestellt.

Das Gen für GST A4 umspannt 18 kb und enthält 7 Exons (Desmots et al. 1998).

```

hGSTA1  1 MAEKPKLHYFNARGRMESTRWLLAAAGVEFEEKFIKSAEDLDKLRNDGYLMFQQVPMVEI
hGSTA2  1 .....S.I.....I.....
hGSTA3  1 ..G.....G.....PI.....G.....G.....S.....
hGSTA5  1 .....S...S...I.....L...LE.....S.L.....
hGSTA4  1 ..AR....P.G.....V..V.....D.E.LETK.Q.Y..QDGNH.L.....
G-site          +   -           +           +
H-site         -  -++

hGSTA1  61 DGMKLVQTRAILNYIASKYNLYGKDIKERALIDMYIEGIADLGEMILLPVCPEEKDAK
hGSTA2  61 .....K.....FSQ...Q...
hGSTA3  61 .....T..M..N.....L.R.....
hGSTA5  61 .....M.....T..V..T.....LI.Q...R...
hGSTA4  61 .....S..H...D.H..F..NL...T...V..TL..L.LLIMH.FLK.DDQQKE
G-site          ++           +   +
H-site                          ++  --

hGSTA1  121 LALIKEKIKNRYFPAFEKVLKSHGQDYLVGNKLSRADIHLVELLYVVEELDSSLISFPL
hGSTA2  121 ....Q..T.....
hGSTA3  121 I.....T.S.....Q.....S.....N...
hGSTA5  121 T..V.....R.....W.....F.....
hGSTA4  121 VVNMAQ.AII...V...I.RG...SF...Q..L..VI.LQTILAL..KIPNIL.A..F
G-site          +

hGSTA1  181 LKALKTRISNLPTVKKFLQPGSPRKPPMDEKSLEEARKIFRF
hGSTA2  181 .....S.....
hGSTA3  181 .....A.A.A.....
hGSTA5  181 .....Q.....
hGSTA4  181 .QEYTVKL..I..I.R..E...KK...P..IYVRTVYN...P
H-site          +   +   +   ++

```

Abbildung 43: Alignment der Aminosäure-Sequenzen der Mitglieder der GST Alpha-Klasse. Dargestellt sind die aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen der 5 Gene des GST Alpha Gen-clusters. Die Positionen für die G- und H-sites (siehe 5.1.7, 5.1.8) sind mit „+“ bezeichnet, wenn sie konserviert sind und mit „-“ wenn dies nicht der Fall ist. Aus Morel et al. (2002).

5.1.5 Expressionsprofil von GST A4

Das Expressionsprofil der Gene des GST Alpha Genclusters wurde von Morel et al. (2002) untersucht. Durch Gen-spezifische RT-PCR konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, daß GST A1, GST A2 und GST A4 in vielen humanen Geweben exprimiert werden. GST A3 konnte dagegen selten nachgewiesen werden, und es fehlen wohl aufgrund von Splicing-Defekten einzelne Exons. Die mRNA für GST A5 konnte von Morel et al. (2002) nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 44 zeigt das Expressionsprofil von humanem GST A4 im ESTProfile der Datenbank UniGene (Hs.485557 GST A4) – Stand IV-2007. Hier ist für eine Anzahl an humanen Geweben der Anteil hGST A4-Transkripte angegeben.

Breakdown by Tissue

Hs.485557

adipose tissue	0	0/12777
adrenal gland	341	11/32215
ascites	49	2/40022
bladder	0	0/29175
blood	8	1/119874
bone	41	3/71667
bone marrow	42	2/47392
brain	87	78/890811
cervix	0	0/47558
cochlea	0	0/16098
colon	11	2/181250
connective tissue	27	4/145437
cranial nerve	0	0/18109
embryonic tissue	41	8/194985
esophagus	52	1/18916
eye	70	14/199696
heart	149	13/87149
kidney	116	24/206123
larynx	0	0/24256
liver	15	3/197800
lung	50	17/333931
lymph	0	0/44428
lymph node	11	1/90609
mammary gland	13	2/151863
mouth	127	8/62897
muscle	18	2/106514
nerve	127	2/15645
ovary	49	5/101128
pancreas	32	7/214089
parathyroid	340	7/20554
pharynx	0	0/41803
pituitary gland	60	1/16586
placenta	71	20/281155
prostate	31	6/189548
salivary gland	49	1/20254
skin	16	3/186159
small intestine	46	2/43311
spleen	19	1/50510
stomach	31	3/95320
testis	88	30/337730
thymus	13	1/74105
thyroid	21	1/47348
tonsil	0	0/17026
trachea	42	2/46887
umbilical cord	0	0/13515
uterus	21	5/228444
vascular	40	2/49597
whole body	116	5/43023
whole brain	157	21/133484

Breakdown by Health State

Hs.485557

adrenal tumor	78	1/12703
bone tumor	30	3/99675
breast (mammary gland) cancer	10	1/93020
cervical tumor	0	0/33938
colorectal cancer	8	1/112359
esophageal tumor	61	1/16386
gastrointestinal tumor	25	3/119030
germ cell tumor	31	8/254527
glioma	18	2/106450
head and neck tumor	60	8/133267
kidney tumor	59	4/67205
leukemia	32	3/93575
liver tumor	22	2/88101
lymphoma	13	1/72121
non-glioma	62	8/128043
non-neoplasia	66	6/90133
normal	74	240/3231433
ovarian tumor	52	4/76097
pancreatic tumor	28	3/104989
prostate tumor	18	2/111050
respiratory tract tumor	19	2/103597
retinoblastoma	0	0/46485
skin tumor	8	1/124880
soft tissue/muscle tissue tumor	7	1/125478
urinary bladder tumor	0	0/26381
uterine tumor	0	0/90251

Breakdown by Developmental Stage

Hs.485557

embryo	44	8/179566
embryoid body	56	4/70535
fetus	108	60/553710
neonate (less than 4 weeks old)	0	0/26593
infant (less than 3 years old)	0	0/21845
juvenile (less than 17 years old)	92	5/53891
adult (17 years old and older)	52	101/1909841

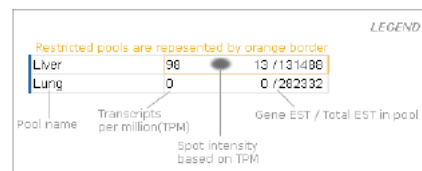


Abbildung 44: Expressionsprofil von hGST A4 im ESTProfile der Datenbank UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.485557>)

GST A4 wird in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert. Besonders stark ist die Expression in Gehirn, Nebenniere, Nebenschilddrüse, Niere und Herz, vgl. auch Hubatsch et al. (1998). Besonders niedrig ist die Expression in Blut, Cervix, Lymphknoten, Lymphe, Mandeln, Milz und Thymus.

Beim Embryo ist die Expression deutlich höher als beim Adulten (siehe auch 4.2).

Bei der Interpretation der in Abbildung 44 dargestellten Daten gilt es aber zu beachten, daß die Daten bei sehr geringer Anzahl an für ein Gewebe vorhandenen ESTs unter Umständen nicht verlässlich sind. So zeigen die Daten aus Abbildung 44 z.B. eine Abwesenheit von hGST A4 beim Neugeborenen aber Anwesenheit beim Embryo und Juvenilen.

5.1.6 Struktur von GST A4

Die Primär- und Sekundärstruktur von humanem GST A4 ist in Abbildung 45 dargestellt.

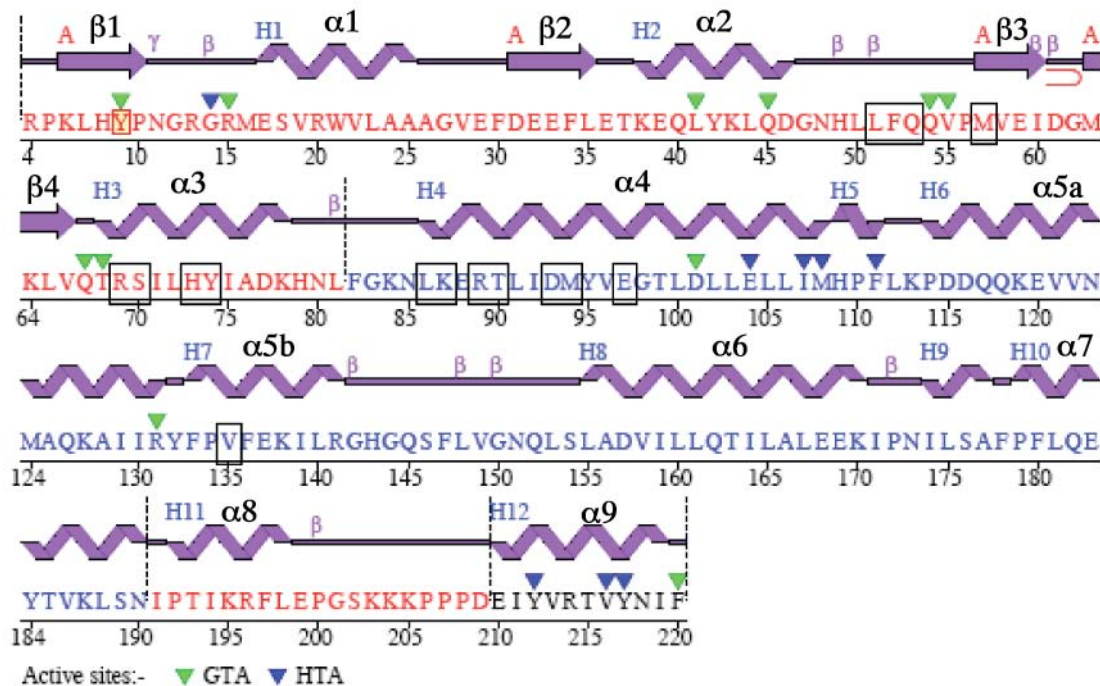


Abbildung 45: Primär- und Sekundärstruktur des GST A4 Proteins. Verändert aus EBI PDBsum – PDB Code: 1GUM – <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum>. Die für die Dimerisierung wichtigen Aminosäuren wurden durch schwarze Kästchen markiert nach Bruns et al. (1999).

Die Kristallstruktur von humanem GST A4 spiegelt die typische Struktur der Glutathion-S-Transferasen wieder und besteht aus zwei strukturellen Domänen (Bruns et al. 1999) (siehe Abbildung 36 und vgl. Abbildung 45):

- einem N-terminalen Bereich, der von den Aminosäuren 1-80 gebildet wird und zu dem manchmal auch die $\alpha 9$ Helix (aa 215-222) gezählt wird, da sie sich in den N-terminalen Bereich rückfaltet (Bruns et al. 1999); dieser Bereich ist charakterisiert durch eine gemischte β -Faltblatt-Struktur, die von α -Helices flankiert wird; damit gehört der N-Terminus strukturell der Thiothredoxin Überfamilie an (Armstrong 1997); im N-Terminus

liegen viele wichtige Bindestellen für Glutathion (G-sites bzw. GTA), siehe Abbildung 45; Tabelle 8 (Babbitt 2000; Armstrong 1997).

- einem C-terminalen Bereich aus α -Helices bestehend aus den Aminosäuren 81 bis 214 (falls die α_9 Helix mit zum N-Terminus gerechnet wird) bzw. bis 222: in diesem Bereich liegen viele wichtige Bindestellen für das elektrophile Substrat (H-sites bzw. HTA) (Babbitt 2000; Armstrong 1997).

Ein Charakteristikum der Alpha-Klasse GSTs ist die C-terminale α_9 Helix, die sich auf die N-terminale Domäne zurückfaltet und an der Bindung von sowohl Glutathion als auch des elektrophilen Substrats beteiligt ist, siehe unten (Bruns et al. 1999).

Glutathion-S-Transferasen besitzen jeweils Bindestellen für Glutathion („G site“ bzw. „GTA“) und Bindestellen für das elektrophile Substrat („H site“ bzw. „HTA“). Die Aminosäuren, die an der Bildung der Bindestellen für Glutathion beteiligt sind, sind unter den GSTs sehr konserviert. Dagegen variieren die Aminosäuren, die die Bindestellen für das elektrophile Substrat bilden, zwischen den verschiedenen GST Enzymen (Bruns et al. 1999). Tabelle 8 zeigt die Aminosäuren, die in GST A4 an der Bildung der Bindestellen für Glutathion (GTA) bzw. das elektrophile Substrat (HTA) beteiligt sind.

Tabelle 8: Aminosäuren, die an der Bildung der Bindestellen für Glutathion (GTA) und des elektrophilen Substrats (HTA) der humanen Glutathion-S-Transferase A4 beteiligt sind. Aus EBI PDBsum – PDB Code: 1GUM und 1GUL – <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum>. Die bei B1-1 fehlenden Aminosäuren sind rot markiert.

GTA		<i>BINDESTELLEN: GLUTATHION</i>			
TYR 9	ARG 15	LEU 41	GLN 45		
GLN 54	VAL 55	GLN 67	THR 68		
ASP 101	ARG 131	PHE 220			
HTA		<i>BINDESTELLEN: ELECTROPHILES SUBSTRAT</i>			
GLY 14	GLU 104	ILE 107	MET 108		
PHE 111	TYR 212	VAL 216	TYR 217		

5.1.7 Bindestellen für elektrophile Substrate (H-site bzw. HTA) in GST A4

An der Bildung der Bindestellen für das elektrophile Substrat, die eine hydrophobe Tasche bilden, sind bei GSTs der Alpha-Klasse drei strukturelle Komponenten beteiligt (Bruns et al. 1999). Bei hGST A4 sind dies (siehe Abbildung 45 und Tabelle 8 und vgl. Abbildung 46):

1. der α_1 - β_1 -loop mit den Aminosäuren Tyr9, Gly12 und Arg15
2. das Ende der α_4 -Helix mit den Aminosäuren Glu104, Ile107, Met108 und Phe111
3. die α_9 -Helix mit den Aminosäuren Tyr212, Val216, Tyr217 und Phe220.

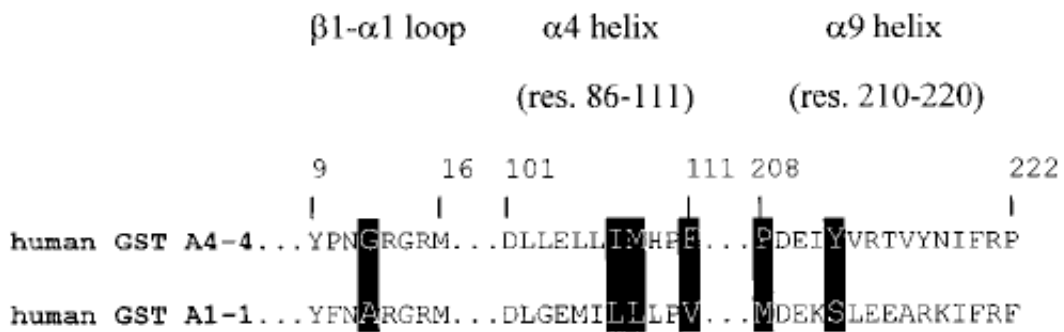


Abbildung 46: Die drei für die Substrat-Spezifität verantwortlichen hydrophoben Module in hGST A4 und hGST A1. Die Aminosäurepositionen in GST A4, die als wichtig für die Interaktion mit Alkenal-Substraten angesehen werden, sind unterlegt. In einem Experiment von Nilsson et al. (2000) wurden die entsprechenden Aminosäuren in GST A1 gegen die von GST A4 ausgetauscht und damit die Substratspezifität des mutierten GST A1 Enzyms zu der von GST A4 geändert, siehe Text. Aus Nilsson et al. (2000).

Die Wichtigkeit dieser drei hydrophoben Module für die Substrat-Bindung wurde von Nilsson et al. (2000) demonstriert. Einige für die Substratspezifität wichtigen Aminosäuren in diesen drei Modulen von GST A1 wurden so mutiert, daß die Substratspezifität in Richtung der von GST A4 geändert wurde (siehe Abbildung 46). Dabei wurde die enzymatische Aktivität für Nonenal (spezifisch für GST A4) um mehr als 300fach gesteigert und die für 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB – spezifisch für GST A1) um mehr als 10fach gesenkt.

Dabei liegt der wichtigste Unterschied bei der Bildung der Bindestellen für das elektrophile Substrat zwischen hGST A4 und dem nahe verwandten hGST A1 in der α 9-Helix. Bei hGST A4 liegt die α 9-Helix auch im unligierten Zustand ohne Substrat in geordnetem Zustand vor (Bruns et al. 1999).

Bei hGST A1 dagegen hat die α 9-Helix ohne Substrat eine flexible Struktur, und erst, wenn ein Substrat gebunden ist, liegt sie geordnet vor (Induzierte Paßform – „induced fit“) (Zhan und Rule 2004; Allardyce et al. 1999). Die α 9-Helix liegt also wie ein Deckel über dem hydrophoben katalytischen Zentrum (O'Sullivan et al. 2006).

Für diesen Unterschied zwischen GST A4 und GST A1 ist möglicherweise ein Unterschied in der Aminosäure-Sequenz zwischen GST A4 und GST A1 verantwortlich. Bei GST A1 befindet sich an Position 10 ein Phenylalanin, dessen Seitenkette den Platz von Phe220 der α 9 Helix bei der Apo-Form der GST A1 einnimmt. In der Liganden-konjugierten Form gibt Phe10 diesen Platz frei. Bei GST A4 befindet sich dagegen an Position 10 ein Prolin, das diesen Platz nicht blockiert (Le Trong et al. 2002). Die Alpha-Helix α 9 hat per se eine geringe Tendenz zur Ausbildung der alpha-helicale Struktur, wird aber durch dreidimensionale Interaktionen (mit dem C-Terminus) stabilisiert (Dirr und Wallace 1999). Die Stabilität dieser Helix wird weiter erhöht durch die Bindung von Liganden im aktiven Zentrum (G- und H-site). Dabei steigt diese Liganden-induzierte Stabilisierung von der Besetzung der H-site alleine, über die Besetzung der G-site alleine und erreicht die größte Stabilität bei gleichzeitiger Besetzung der G- und H-site (Dirr und Wallace 1999). Durch diese Art der Stabilisierung erhöht sich auch die Affinität der Ligandin-Bindestellen für Nicht-Substrat Moleküle (siehe unten).

Da die Konzentration von reduziertem Glutathion in humanen Zellen mit bis zu 10 mM recht hoch ist, Dirr und Wallace (1999), vgl. Richie et al. (1996), liegt GST A1 wahrscheinlich überwiegend mit stabilisierter α 9 Helix in den Zellen vor.

Für die Substrat-Spezifität von hGST A4 für HNE scheint Tyr212 in der α 9-Helix von zentraler Bedeutung zu sein. Dies wurde aus der Kristallstruktur abgeleitet und durch Mutations-Analysen gestützt (Bruns et al. 1999). Tyr212 aktiviert das elektrophile Substrat, indem es eine Wasserstoffbrückenbindung zu ihm ausbildet. Dabei macht Tyr212 Kontakte mit Gly12 im N-terminalen Bereich. Damit Tyr212 die richtige Position einnehmen kann, ist die Interaktion mit Gly12 nötig – wenn Gly dabei durch eine Aminosäure mit Seitenkette ersetzt wird, kann Tyr212 nicht mehr die korrekte Position einnehmen, und somit geht die Substrat-Spezifität für HNE verloren (Bruns et al. 1999).

5.1.8 Aktivierung des Glutathions bei GST A4

Glutathion ist bei GST A4 so gebunden, daß das Tyr9 in Richtung des Schwefel-Atoms von Glutathion orientiert ist und dieses für den nukleophilen Angriff aktiviert (Bruns et al. 1999 und Armstrong 1997). Dabei bildet die Hydroxyl-Gruppe des Tyrosyl-Rests mit dem Schwefel-Atom des Glutathions eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Zusätzlich wird diese Interaktion durch die positive Ladung des Arginins an Position 15 stabilisiert, siehe Abbildung 47 und vgl. Abbildung 36.

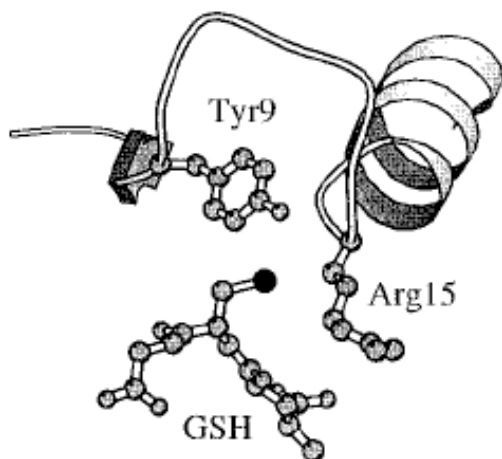


Abbildung 47: Für die Aktivierung des Glutathions wichtige Aminosäuren bei GST A4. Tyr9 aktiviert das Schwefel-Atom in Glutathion (GSH), das schwarz dargestellt ist. Die Interaktion mit GSH wird zusätzlich durch Arg15 stabilisiert. Aus Armstrong (1997).

5.1.9 Dimerisierung

Die zytosolischen GSTs kommen als Dimere vor (Armstrong 1997). Das Dimer-Interface bildet dabei auch eine nicht-katalytische Bindestelle für Liganden („Ligandin“-Funktion der GSTs, siehe unten) (Hayes et al. 2005).

Bei Klasse Alpha GSTs (und Klassen Mu und Pi) ist ein hydrophobes Schlüssel-Schloß Motiv zwischen den Untereinheiten ein wesentliches strukturelles Merkmal. Durch dieses Schlüssel-

Schloß Motiv wird die quarternäre Struktur stabilisiert. Dabei wird der „Schlüssel“ von Phe52 gebildet (Sayed et al. 2000). Mutationen dieses konservierten Phenylalanins zeigen, daß dieses „Schlüssel“-Phenylalanin zwar nicht essentiell für die Dimerisierung ist. Allerdings ist die katalytische Funktion und die Fähigkeit Nicht-Substrat Moleküle zu binden (Ligandin-Funktion, siehe unten) verändert. Der Grund dafür ist eine Störung der benachbarten dreidimensionalen Struktur des katalytischen Zentrums an der G-site (Sayed et al. 2000).

Phe52 steht aus einem loop des einen Monomers hervor und paßt in eine hydrophobe Tasche zwischen den α -Helices 4 und 5 der anderen Untereinheit, siehe Gustafsson et al. (2002), vgl. Abbildung 45. Durch dieses Dimer Interface kann die Stabilität der Konformation und die Faltung der GSTs beeinflusst werden (Sayed et al. 2000).

Untersuchungen mit GSTs der Klasse Pi haben gezeigt, daß die Dimer-Bildung die Tertiärstruktur der einzelnen Monomere stabilisiert (Armstrong 1997). Es ist nicht bekannt, ob dies auch auf die Alpha-Klasse GSTs zutrifft.

GST A4 kann (zumindest *in vitro*) Heterodimere mit GST A1 bilden, die als GST A1-4 bezeichnet werden. Gustafsson et al. (2002) exprimierten die beiden Monomere heterolog in *E. coli* und zeigten, daß GST A1-4 Heterodimere gebildet werden können. Da GST A1-1 und GST A4-4 unterschiedliche Substratspezifitäten haben – GST A1 v.a. für CDNB und GST A4 v.a. für Nonenal (siehe oben) – konnte die enzymatische Aktivität des GST A1-4 Heterodimers gemessen werden, und auf diese Weise konnten Hinweise gefunden werden, ob die Untereinheiten im Dimer voneinander unabhängig sind. Dabei stellte sich heraus, daß im Heterodimer GST A1-4 beide Untereinheiten katalytisch aktiv sind. Allerdings zeigten sie im Vergleich zu den Homodimeren verminderte enzymatische Aktivität (Gustafsson et al. 2002). Misquitta und Colman (2005) untersuchten mit Heterodimeren aus Wildtyp und Mutanten von hGST A1, ob die enzymatische Aktivität der GSTs anhängig von der Dimerisierung ist. Dabei stellte sich heraus, daß die Mutation einer Aminosäure in der einen Untereinheit die enzymatische Aktivität der anderen Untereinheit mitbeeinflusst. Die katalytischen Zentren der beiden Untereinheiten scheinen also miteinander verbunden zu sein. So interagiert Arg131 in der einen Untereinheit mit Tyr9 und Arg15 bei der Bindung von Glutathion der anderen Untereinheit (Misquitta und Colman 2005), siehe oben und Abbildung 47.

Für die Stabilität des Dimers ist Trp20 wichtig. Dessen Indol-Seitenkette steht aus der einen Untereinheit hervor und paßt in eine hydrophobe Tasche der anderen Untereinheit (gebildet von den Aminosäure-Positionen 157, 161 und 164 in der α_6 Helix und 196 und 197 in der α_8 Helix) (Wallace et al. 2000). Mutationen von Trp20 destabilisierten das Dimer deutlich.

5.1.10 Ligandin-Funktion von GST A4

Die Ligandin-Funktion ermöglicht es den GSTs eine große Vielzahl an Nicht-Substrat Molekülen zu binden und diese aufzunehmen, zu transportieren oder zu speichern (Sayed et al. 2002). Diese Liganden schließen z.B. Häm, Bilirubin, Gallensalze, Steroide, Schilddrüsenhormone, Fettsäuren und Medikamente ein, siehe z.B. Kolobe et al. (2004); Oakley et al. (1999).

Über die Ligandin-Funktion der Glutathion-S-Transferasen ist relativ wenig bekannt. Die Lage und Eigenschaften der Ligandin-Bindestellen sind größtenteils unbekannt, siehe z.B. Kolobe et al. (2004). Die Bindung der Nicht-Substrat Moleküle kann die katalytische Funktion der GSTs inhibieren (Sayed et al. 2002).

Die Stöchiometrie der Nicht-Substrat Liganden und des GST-Dimers variiert und ist u.a. abhängig von der Größe des Liganden und der Ort der Bindung in GST (Sayed et al. 2002).

Eine Bindestelle für Nicht-Substrat Liganden stellt die offene Struktur der Spalte zwischen den Dimer Untereinheiten dar (siehe oben, vgl. Abbildung 36). Diese Spalte entlang des Dimer-Interfaces kann z.B. Aflatoxin B oder Steroid-Sulfate binden (Sayed et al. 2002). Eine weitere Bindestelle für verschiedene hydrophobe Substrate überlappt mit der H-site (gezeigt für GSTs der Klasse Pi (Kolobe et al. 2004)). Diese Bindestelle ist bei vielen GST Klassen konserviert (Oakley et al. 1999).

5.2 Informationen zum Vacuolar Protein Sorting 28 (VPS 28) aus Literatur und Internet-Datenbanken

5.2.1 Allgemeines

VPS 28 ist Teil des ESCRT-I Komplexes. Der ESCRT-I Komplex ist wiederum Teil des ESCRT Protein-Komplexes, der v.a. in Endosomen für Sortierung und Transport ubiquitinerter Transmembranproteine in Vesikel sorgt. So ist der ESCRT-Komplex an der Entstehung des MVB (multivesicular body) Kompartiments maßgeblich beteiligt.

In Eukaryonten werden Proteine der Zelloberfläche über den MVB (multivesicular body) pathway degradiert, z.B. aktivierte Wachstumsrezeptoren wie EGF oder falsch gefaltete Transmembranproteine usw., siehe z.B. Katzmann et al. (2002); Bishop et al. (2002). Dabei werden Transmembranproteine über Ubiquitinierung dem MVB-Kompartiment zugeführt und schließlich im Lysosom degradiert, siehe z.B. Hicke (2001). MVBs spielen außerdem auch eine Rolle bei:

- der Aufnahme von Nährstoffen
- Zell-Kommunikation
- Immunantworten
- Budding einiger Retroviren (HIV und andere) – siehe unten.

Abbildung 48 zeigt schematisch eine Übersicht der Funktionen des MVB Kompartiments.

Die MVB-Maschinerie besteht aus 3 Protein-Komplexen:

- ESCRT-I (enthält VPS 28!)
- ESCRT-II
- ESCRT-III.

Einen kurzen Überblick gibt z.B. Conibear (2002).

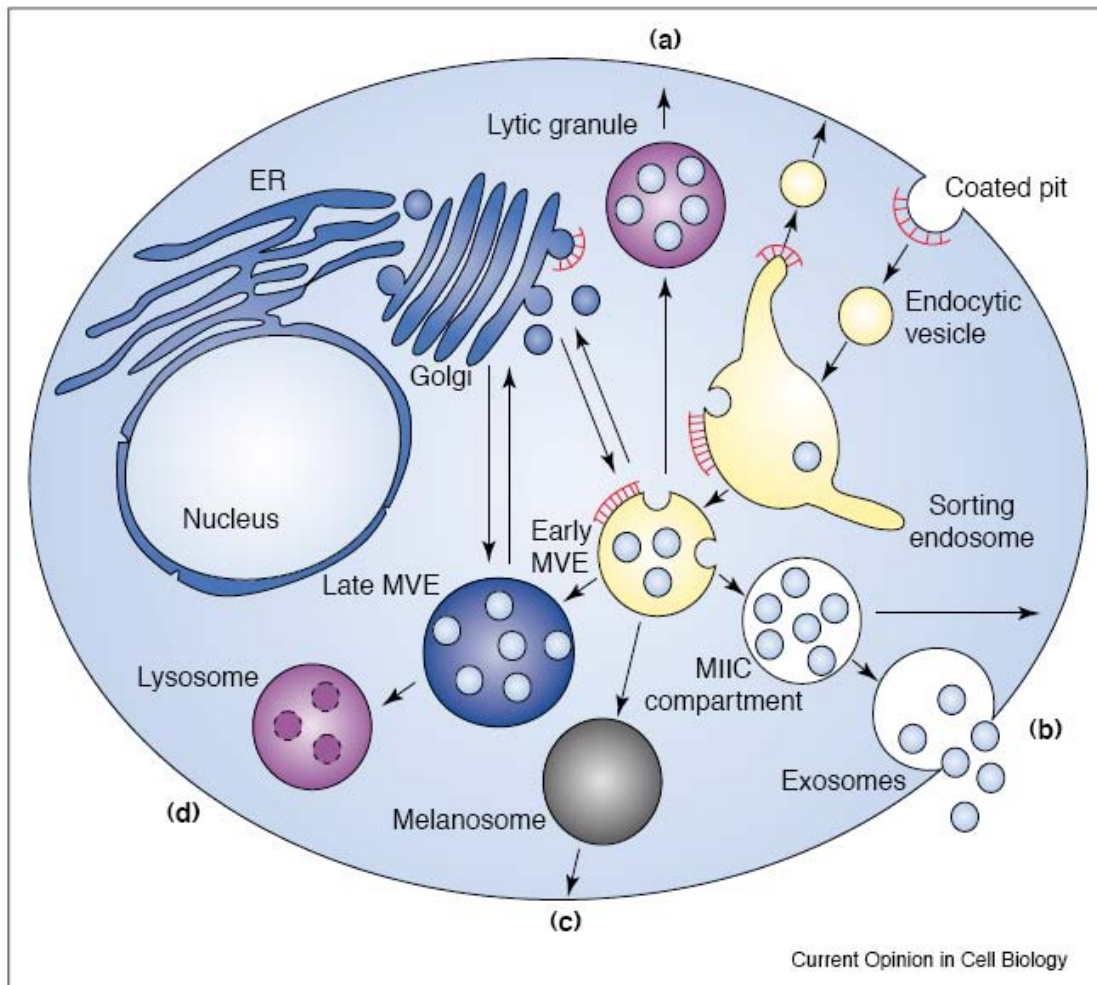


Abbildung 48: Übersicht über die Bildung und Funktionen des MVB (multivesicular body) Kompartiments. MVBs werden gebildet, indem sich die äußere Membran eines Endosoms einstülpt und abknospt. An diesem Prozeß sind die ESCRT Proteinkomplexe beteiligt, zu dem auch VPS 28 gehört. MVBs können verschiedene Funktionen in verschiedenen Zelltypen erfüllen: als Vorstufen für lytische Vesikel in T-Zellen (a), als Vorstufen von MHC Klasse II Kompartimenten und Exosomen in Antigen-präsentierenden Zellen (b), als Melanosomen in Melanocyten (c), als späte multivesikuläre Endosomen, die im Lysosom verdaut werden (d). Aus Raiborg et al. (2003).

Die Protein-Komplexe der MVB-Maschinerie werden aus dem Zytoplasma an die Zellmembran rekrutiert und interagieren dort mit Lipiden und ubiquitinierten Proteinen. Ubiquitinierung von Membranproteinen führt dazu, daß sie sich in Clathrin- ausgekleideten Bereichen der Membran ansammeln (Sachse et al. 2002). Diese Membranbereiche knospen ins Zytosol ab und bilden Vesikel, die in das Endosom transportiert werden.

An der Membran des Endosoms bewirkt Ubiquitin wiederum das Sorting der ubiquitinierten Proteine, wie z.B. Rezeptoren oder anderer Proteine, so daß sie in Vesikeln ins Lumen des Endosoms knospen (Hicke 2001; Urbanowski und Piper 2001). Das Endosom sammelt so viele interne Vesikel an und wird so zum MVB = multivesicular body (Katzmann et al. 2002). Wenn die im MVB enthaltenen Proteine degradiert werden, fusioniert schließlich die äußere Membran des dann als spätes multivesikuläres Endosom bezeichneten MVBs mit dem Lysosom. Dessen Lipasen und Proteasen verdauen sowohl die Vesikel als auch deren Protein-Inhalt, siehe z.B. Raiborg et al. (2003).

Die Vacuolar Protein Sorting (VPS) Maschinerie ist verantwortlich für die Selektion der zu transportierenden Proteine und den Transport in Vesikeln. Mit Hilfe von *vps*-Mutanten in Hefe wurde viel über die Funktionen der zugehörigen Proteine aufgeklärt, siehe z.B. Raymond et al. (1992). Die VPS-Proteine sind von Hefe bis zum Menschen konserviert, vgl. Abbildung 55, und erfüllen analoge Funktionen, siehe z.B. Hurley und Emr (2006).

5.2.2 Funktion der ESCRT-Protein-Komplexe

Die ESCRT-Komplexe, deren Protein-Untereinheiten meist die Bezeichnung VPS (wie z.B. VPS 28) tragen, bewirken das Sorting von Proteinen in Vakuolen, die schließlich das MVB (multivesicular body) Kompartiment bilden. ESCRT steht dabei für „endosomal sorting complex required for transport“. Viel über Funktionsweise und Struktur der ESCRT Komponenten wurde erst in den letzten Jahren aufgeklärt. Aufgrund der Konserviertheit vieler VPS Proteine von Hefe bis zum Menschen gibt es oft alternative Namen für ein und dasselbe Protein, vgl dazu Tabelle 9.

Tabelle 9: Orthologe der ESCRT-Proteine und akzessorischer Proteine in Hefe, Mensch, Fruchtfliege und Nematoden. Aus Slagsvold et al. (2006).

ESCRT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			<i>Homo sapiens</i>		<i>Drosophila melanogaster</i>		<i>Caenorhabditis elegans</i>				
	No.	Accession*		No.	Accession	Other names	No.	Accession	Other names			
I	Vps23p/	1	NP_009919	1	NP_006283	Tsg101	1	NP_524120	Tsg101	1	NP_500364	C09G12.9
	Stp22p^b											
	Vps28p	1	NP_015260	2	NP_057292 ^e NP_898880 ^f		1	NP_652053	CG12770	1	CAB54493	Y87G2A.10
	Vps37p/	1	NP_013220	4	AAH22363 NP_078943 NP_060436 XP_379866	Vps37A/HCRP1 Vps37B/FLJ12750 Vps37C/FLJ20847 Vps37D/Wbscr24	2	AY070595 AY069687	RE69619 LD45836	1	NP_504474	CD4.4
II	Vps22p/	1	NP_015323	1	NP_009172	EAP30	1	NP_650987	CG6637	1	NP_498052	C27F2.5
	Snf8p											
	Vps25p	1	NP_012636	1	NP_115729	EAP20	1	NP_610398	CG14750	1	NP_493230	W02A11.2
	Vps36p/	1	NP_013521	1	NP_057159	EAP45	1	NP_648660	CG10711	1	NP_505798	tag-318/ F17C11.8
	Vac3p											
■	Vps2p/	1	NP_012924	2	NP_055268 ^e NP_940818 ^e NP_054762	CHMP2A CHMP2B	1	NP_651455	CG14542	1	NP_496717	Y46G5A.12
	Did4p											
	Vps20p/	1	NP_013794	1	NP_078867	CHMP6	2	NP_726213 NP_611686	CG4071-PB: A and B	1	NP_490762	Y65B4A.3
	Chm6p											
	Vps24p/	1	NP_012883	2	NP_057163 ^e NP_00100575 3 ^e	CHMP3	1	NP_649451	CG9779	1	NP_494919	T27F7.1
	Did3p											
	Vps32p/	1	NP_013125	3	NP_054888 NP_789782 AAH14321	HSPC134/ CHMP4A CHMP4B CHMP4C	1	NP_610462	CG8055	2	NP_505022 AAA68771	C37C3.3 tag-309/ C56C10.3
	Snf7p											
Others	Vps4p/	1	NP_015499	2	NP_037377.1 NP_004860.2	Vps4A Vps4B	1	NP_573258	CG6842	1	NP_490816.3	Y34D9A.10
	Did6p											
	Vps27p/	1	NP_014403	1	NP_004703.1	Hrs/HGS	3	NP_722831 NP_525099 NP_722830	Hrs/ CG2903 A, B and C	1	NP_501375.2	hgrs-1
	Did7p											
	Hse1p	1	NP_011861.1	2	NP_003464 NP_005834	STAM1 STAM2	1	NP_477448	Stam	1	NP_491710.2	pqn-19
	Vps31p/	1	NP_015241	1	NP_037506.2	Alix/AIP1/DRIP4	1	NP_651582	CG12876	4	NM_066812 ³ NM_001027543 ³ NM_001027542 ³ NM_001027544 ³	alx-1
	Bro1p											
	Vps44p/	1	NP_010744.1	1	NP_006350.1	SLC9A6	nd	nd				nd
	Nhx1p											
	Vps46p/	1	NP_012961.1	2	NM_002768 NP_065145.2	CHMP1A CHMP1B	1	NP_649051, 3 CG4108	Chmp1/ CG4108	1	NP_490974.1	F23C8.6
Did2p												
Vps60p/	1	NP_010774.2	1	NP_057494.2	CHMP5	1	NP_648997	CG6259	1	NP_505219.1	F41E6.9	
Mos10p												
Vta1p	1	NP_013282.1		NM_016485	LIP5/SBP1		NP_647640	CG7967		NP_492139.2	T23G11.7	

Abbildung 49 zeigt eine Übersicht der Funktion der ESCRT Komplexe. Zuerst wird ESCRT-I über den VPS27/HseI-Komplex (bzw. Hrs/STAM1-Komplex) an die Endosomen-Membran lokalisiert und interagiert dort mit dem ubiquitinierten Cargo. Die Cargo-Proteine werden an ESCRT-II und ESCRT-III übergeben, angereichert und schließlich in MVB Vesikel sortiert, siehe auch Abbildung 51.

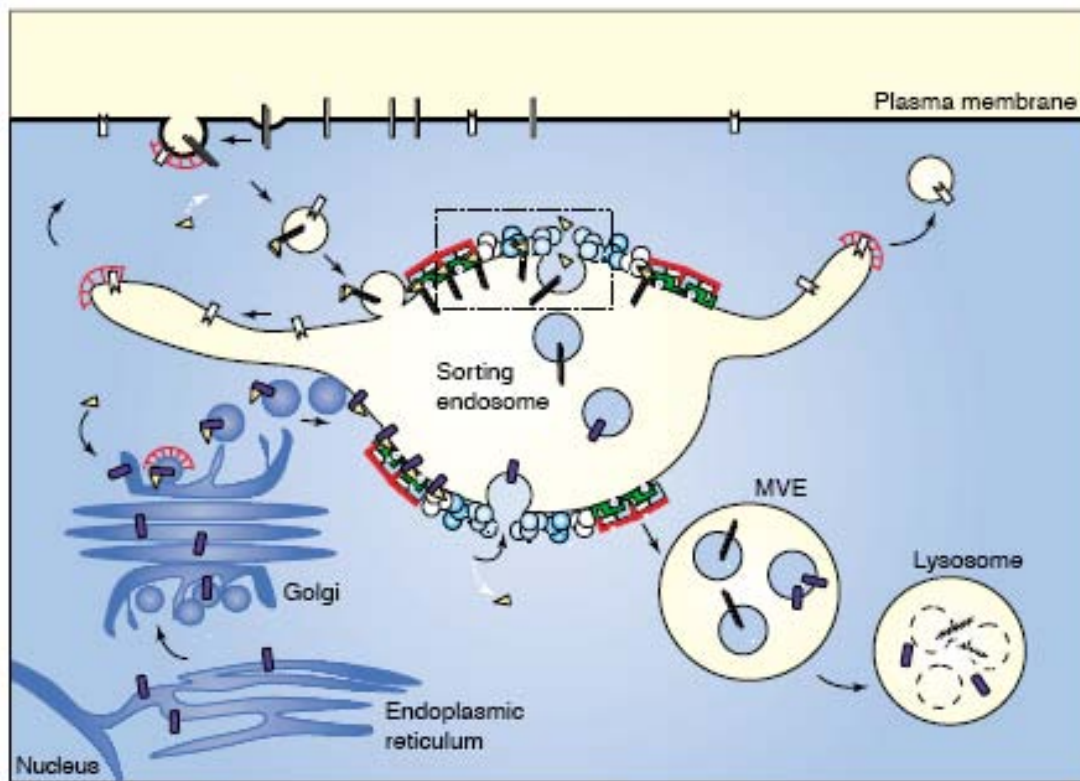


Abbildung 49: Schematische Darstellung des Sortings ubiquitinierten Membran-Proteinen in MVEs (multivesikulär Endosomes) und Degradierung im Lysosom. Ubiquitin (als gelbe Dreiecke dargestellt) wird an Proteine gebunden, die vom Golgi Apparat oder der Plasmamembran kommen. Dadurch werden diese Proteine an bestimmten Bereichen der Endosomenmembran, die Clathrin und das Protein Hrs enthalten, zurückgehalten. Das bewirkt das Sorting dieser Proteine in Vesikel und schließlich deren Verdauung im Lysosom. Proteine, die nicht ubiquitiniert sind, werden nicht durch Hrs/Clathrin zurückgehalten und gelangen wieder an die Plasmamembran. Aus Raiborg et al. (2003).

5.2.3 Struktur und Funktion von VPS 28 bzw. des ESCRT-I Komplexes

Der ESCRT-I Komplex hat ein Molekulargewicht von 350 kD und besteht aus drei Untereinheiten im 1:1:1 Verhältnis (Kostelansky et al. 2006):

- VPS 23
- VPS 28
- VPS 37.

Kürzlich wurde ein weiteres Protein mit der Bezeichnung Mvb12 als Komponente des ESCRT-I Komplexes neu entdeckt, siehe Oestreich et al. (2007); Curtiss et al. (2007). Mit Mvb12 bilden die anderen ESCRT-I Komponenten ein 1:1:1:1 Heterotetramer (Gill et al. 2007). Da aber über die Funktion des Mvb12 Proteins sehr wenig bekannt ist, wird es im folgenden nicht berücksichtigt.

Die Struktur des ESCRT-I Komplexes besteht aus einem starren Kern (Core), der von Teilen aller drei Untereinheiten gebildet wird, und drei flexiblen Armen, die jeweils von einer Untereinheit gebildet werden. Über die flexiblen Arme finden die Interaktionen mit den anderen Untereinheiten und mit Cargo-Proteinen statt.

Abbildung 50 zeigt schematisch den Aufbau der ESCRT-I und ESCRT-II Komplexe. Beide ESCRT-Komplexe bestehen aus einem starren zentralen Teil (Core), der kristallisiert werden konnte (siehe unten), und flexiblen Domänen, die aus der zentralen Struktur herausragen.

Der Core des ESCRT-I Komplexes besteht aus:

- dem C-terminalen Teil von VPS 37,
- dem C-terminalen Teil von VPS 23 und
- dem N-terminalen Teil von VPS 28.

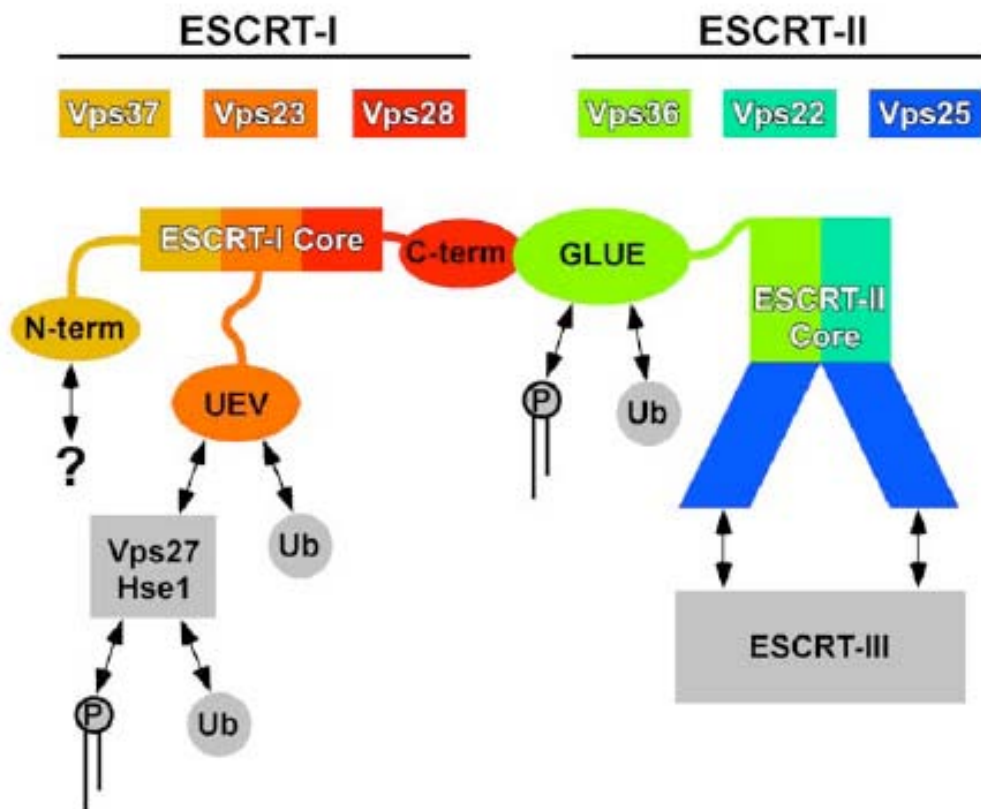


Abbildung 50: Schematische Darstellung des ESCRT-I Komplexes (enthält VPS 28) und des ESCRT-II Komplexes. Erläuterung siehe Text. Aus Babst (2006).

Der ESCRT-II Komplex besteht ebenfalls aus einem starren zentralen Teil (Core) und flexiblen daraus hervorstehenden Bereichen (Hierro et al. 2004). Der ESCRT-II Komplex ist aus folgenden Untereinheiten aufgebaut:

- VPS 36 mit der flexiblen GLUE Domäne
- VPS 22 und
- zwei Teilen VPS 25.

Über die flexiblen Seitenarme finden verschiedene funktionell bedeutsame Interaktionen statt:

- über die UEV-Domäne von VPS 23 mit VPS27/Hse1 (bzw. Hrs/STAM1), das den ESCRT-I Komplex an die Membran dirigiert (siehe oben) und selbst mit bestimmten Membranlipiden (z.B. Phosphatidylinositol-3-phosphat) und dem ubiquitinierten Cargo-Protein interagiert
- mit dem ubiquitinierten Cargo-Protein über die UEV-Domäne von VPS 23 und die GLUE-Domäne von VPS 36
- mit bestimmten Membranlipiden (wie z.B. Phosphatidylinositol-3-phosphat) über die UEV-Domäne von VPS 23.

Über die Interaktion der C-terminalen Domäne von VPS 28 des ESCRT-I Komplexes mit der GLUE-Domäne von VPS 36 des ESCRT-II Komplexes findet die Interaktion zwischen ESCRT-I und ESCRT-II statt. Die VPS 25 Untereinheiten des ESCRT-II Komplexes ist verantwortlich für die Herstellung des Kontaktes zum ESCRT-III Komplex.

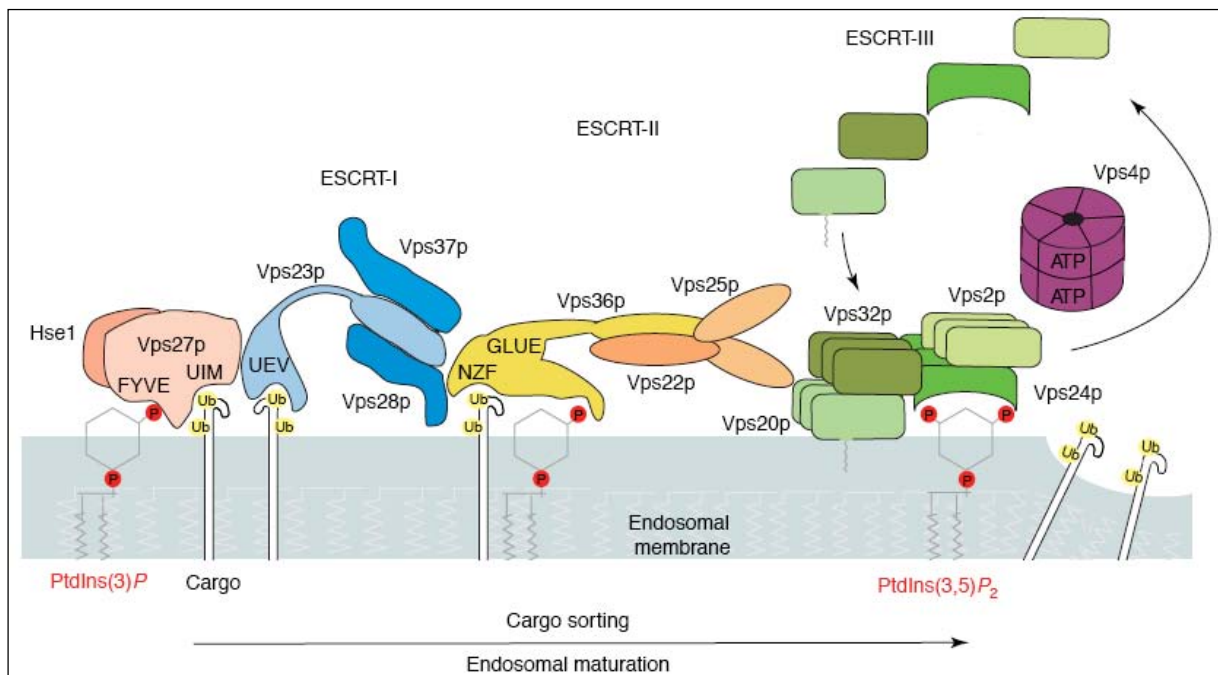


Abbildung 51: Ablauf des sorting von ubiquitinierten Proteinen in Vesikel durch die ESCRT-Maschinerie. Zur Erklärung siehe Text. Aus Slagsvold et al. (2006).

Der gesamte Prozeß des Sorting von Proteinen in Vesikel durch die ESCRT-Maschinerie ist in Abbildung 51 dargestellt. Transmembranproteine, die ubiquitiniert sind und in der Endosomenmembran sitzen, werden über Hse1/VPS 27 (bzw. Hrs/STAM1) kontaktiert und in Membranbereiche konzentriert, die reich an bestimmten Phospholipiden (wie Phosphatidylinositol-3-phosphat) sind (Gillooly et al. 2003), indem Hse1/VPS 27 diese Phospholipide zu

binden vermag. Der ESCRT-I Komplex kontaktiert über die UEV-Domäne der Untereinheit VPS 23 einerseits HSE1/VPS 27 und wird so aus dem Zytoplasma an die Membran geholt (Razi und Futter 2006). Andererseits wird über die UEV-Domäne das ubiquitinierte Cargo-Protein kontaktiert. Über den C-terminalen Teil von VPS 28 wird der Kontakt zum ESCRT-II hergestellt. Die GLUE-Domäne der Untereinheit VPS 36 bindet sowohl VPS 28 als auch das ubiquitinierte Cargo-Protein, das auf diese Weise an ESCRT-II übergeben wird (Teo et al. 2006). Die beiden VPS 25 Untereinheiten des ESCRT-II Komplexes rekrutieren ESCRT-III, indem sie dessen Untereinheit VPS 20 binden (Babst et al. 2002). Der ESCRT-III Komplex assoziiert mit der Membran vermutlich über Myristylierung der VPS 20 Untereinheit und durch die Fähigkeit der VPS 24 Untereinheit, bestimmte Membranlipide zu binden. ESCRT-III bildet an der Membran als Heteromultimer und bewirkt dadurch vermutlich die Einstülpung der Membran (Slagsvold et al. 2006). Durch die ATPase-Aktivität von VPS 4 werden die ESCRT-III Moleküle wieder ins Zytoplasma entlassen und das Vesikel schnürt sich nach innen in das Endosom ab (Bishop und Woodman 2000).

Bevor das Vesikel sich abschnürt, werden de-ubiquitinierende Enzyme durch ESCRT-III rekrutiert, die dafür sorgen, daß Ubiquitin nicht mit ins Vesikel kommt und möglicherweise im Lysosom verdaut wird, sondern recycelt wird (Dupre und Haguener-Tsapis 2001; McCullough et al. 2006).

5.2.4 Kristallstruktur des ESCRT-I Komplexes und von VPS 28

Die Kristallstruktur des Core von ESCRT-I konnte kürzlich aufgeklärt werden (Kostelansky et al. 2006). Er wird gebildet aus dem C-Terminus von VPS 23, dem N-Terminus von VPS 28 und dem C-Terminus von VPS 37. Aus diesem Core ragen flexible Seitenarme aller 3 Untereinheiten hervor, siehe oben. Jede der drei Untereinheiten enthält ein strukturell ähnliches Paar an Alpha-Helices. Die Kristallstruktur des ESCRT-I core zeigt Abbildung 52.

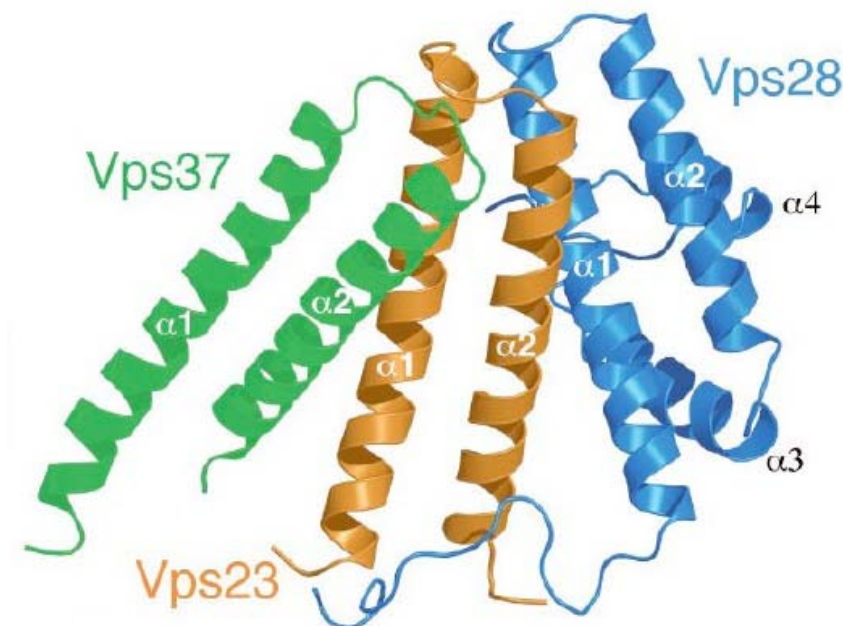


Abbildung 52: Darstellung des ESCRT-I core. Erläuterungen siehe Text. Aus Kostelansky et al. (2006).

5.2.5 Rolle der ESCRT Komplexe beim Budding von HIV (und anderen Retroviren)

HIV, weitere Retroviren und Ebola-Virus interagieren mit Komponenten der ESCRT Maschinerie. Diese Interaktionen sind notwendig für das Ausknospen (Budding) dieser Viren aus den Zellen (Martin-Serrano et al. 2001, 2003b; Pornillos et al. 2002b).

Die Gag-Proteine spielen bei der Freisetzung der Retroviren aus infizierten Zellen eine wichtige Rolle. Das HIV Gag-Protein besitzt im C-terminalen Bereich die p6 Domäne. Diese enthält die Tetrapeptid-Signalsequenz PTAP, die sogenannte L-Domäne (late-budding domain) (Demirov und Freed 2004). Diese PTAP-Sequenz ist (fast) identisch zu der in Hrs (Pornillos et al. 2002a, 2003; Clague und Urbe 2003). (Hrs ist das Protein, das ESCRT-I bindet und an die Plasmamembran dirigiert – siehe oben Abbildung 51.) Sowohl Hrs als auch Gag-Protein mit PTAP Sequenz können mit Tsg101 = VPS23 in ESCRT-I interagieren (Katzmann et al. 2003; Bache et al. 2003).

Abbildung 53 illustriert die Parallelen des Sortings von Proteinen in Vesikel und des Budding von HIV.

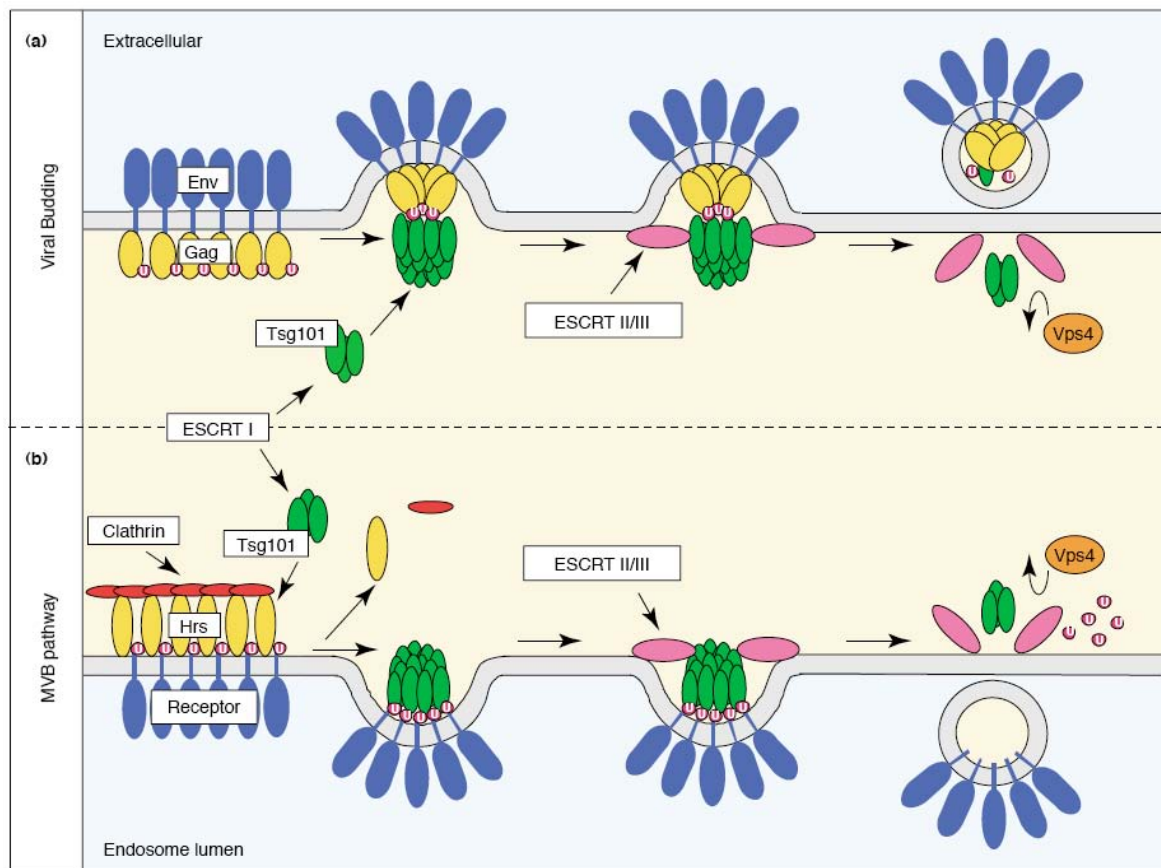


Abbildung 53: Parallelen zwischen dem sorting ubiquitiniertes Membranproteine via MVB pathway und viralem Budding. b) Im MVB pathway werden ubiquitinierte Membranproteine wie z.B. Rezeptoren in Membranbereichen der Endosomenmembran konzentriert, die mit Clathrin ausgekleidet sind. Für die Inkorporation dieser ubiquitinierten Proteine in Vesikel, die sich nach innen abschnüren, ist zunächst die Interaktion mit Tsg101 (= VPS 23) des ESCRT-I Komplexes nötig. Unter Beteiligung weiterer Komponenten der ESCRT Maschinerie schnürt sich schließlich das Vesikel nach innen ab. **a)** Budding von HIV-1 aus der Plasmamembran. Das Gag Polyprotein bewirkt das selfassembly der Viruspartikel an der Plasmamembran. Über die L-Domäne von Gag wird Tsg101 (= VPS 23) des ESCRT-I Komplexes rekrutiert. Über Prozesse, die parallel zum MVB

pathway verlaufen, werden HIV-Partikel von der Plasmamembran nach außen freigesetzt. Aus Clague und Urbe (2003).

Nicht nur ein intakter ESCRT-I Komplex inklusive aller Komponenten (insbesondere auch VPS 28) ist essentiell nötig für das Budding von HIV (Martin-Serrano et al. 2003b), sondern auch weitere Komponenten der ESCRT-Maschinerie wie VPS 4 und der ESCRT-III Komplex (Garrus et al. 2001; Strack et al. 2003; von Schwedler et al. 2003).

Sowohl der Transport von Proteinen über die MVBs als auch das Budding der Retroviren wird über Ubiquitin-Ligasen reguliert. Die Gag L-Domänen werden ubiquitiniert (Patnaik et al. 2000; Strack et al. 2000). Die Freisetzung von Viren mit PTAP-Motiv, wie bei HIV, kann durch Proteasom-Inhibitoren gehemmt werden, wahrscheinlich weil diese die verfügbare Menge an Ubiquitin verringern (Patnaik et al. 2000).

Eine Beteiligung von ESCRT-II am Prozeß des Budding konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Slagsvold et al. 2006). Aus der Kristallstruktur konnte abgeleitet werden, daß die C-terminale Domäne von VPS 28 (Teil des ESCRT-I Komplexes) direkt die VPS 20 Untereinheit des ESCRT-III Komplexes kontaktieren kann (Pineda-Molina et al. 2006).

In Makrophagen knospt HIV zunächst in MVBs – diese fusionieren dann mit der Plasmamembran. Auf diese Weise werden die Viren freigesetzt (Raposo et al. 2002; Pelchen-Matthews et al. 2003) siehe auch Abbildung 54.

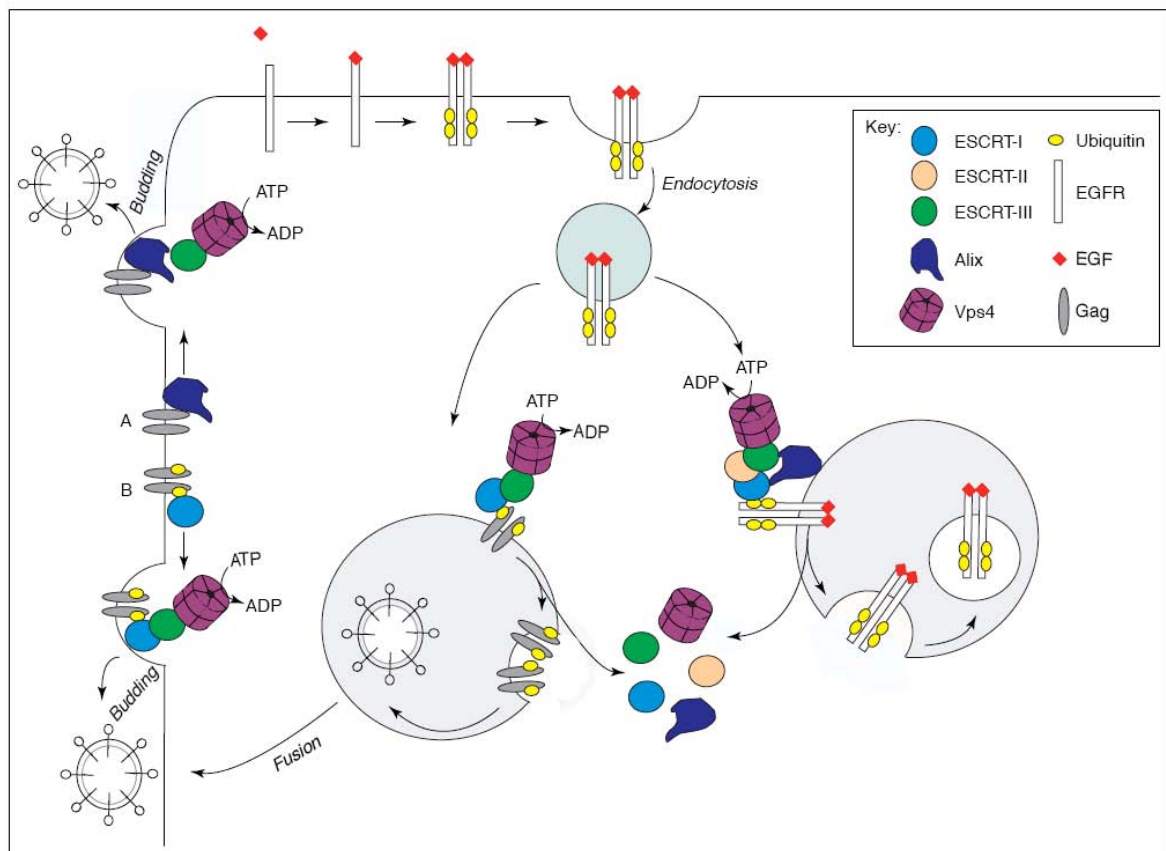


Abbildung 54: Gebrauch der ESCRT Maschinerie durch Viren. Obere Hälfte der Abbildung: ubiquitinierte Proteine der Zellmembran (wie z.B. EGF-Rezeptor nach der Bindung von EGF) werden endocytisiert. An der Endosomenmembran werden die ubiquitinierten Proteine von ESCRT-I, -II und -III erkannt und in multivesicular bodies (MVBs) sortiert (rechter Teil der Abbildung). Auf

ähnliche Weise können ubiquitinierte Gag-Proteine ESCRT-I und -III rekrutieren. Auf diese Weise knospt HIV in Makrophagen zunächst in MVBs, die dann mit der Plasmamembran fusionieren und so die Viren freisetzen (untere linke Hälfte der Abbildung). Alternativ können Gag-Proteine auch mit der Plasmamembran interagieren und über Interaktionen mit verschiedenen Bestandteilen der ESCRT Komplexe das Budding bewirken (linke Hälfte der Abbildung). Aus Slagsvold et al. (2006).

Alternativ können die Viren direkt aus der Plasmamembran knospen. Hier wird ESCRT-I an die Plasmamembran rekrutiert und interagiert mit den Gag-Proteinen. Verschiedene Viren mit unterschiedlichen L Domänen benutzen unterschiedliche Adapter-Moleküle, die sie auf unterschiedliche Weise mit der ESCRT-Maschinerie verbinden (Martin-Serrano et al. 2003a), vgl. auch Abbildung 54.

5.2.6 Genomische Organisation und Expressionsprofil von VPS 28

Abbildung 55 zeigt die Aminosäuresequenz von VPS 28 verschiedener Organismen von Hefe bis zum Menschen und illustriert damit die Konserviertheit dieses Proteins in der Evolution. Außerdem sind in dieser Abbildung die Bereiche markiert, die zur Konstruktion der VPS 28 Fragmente benutzt und auf Interaktion mit Rev untersucht wurden, siehe 3.2.1.4 und 4.4.2.2.

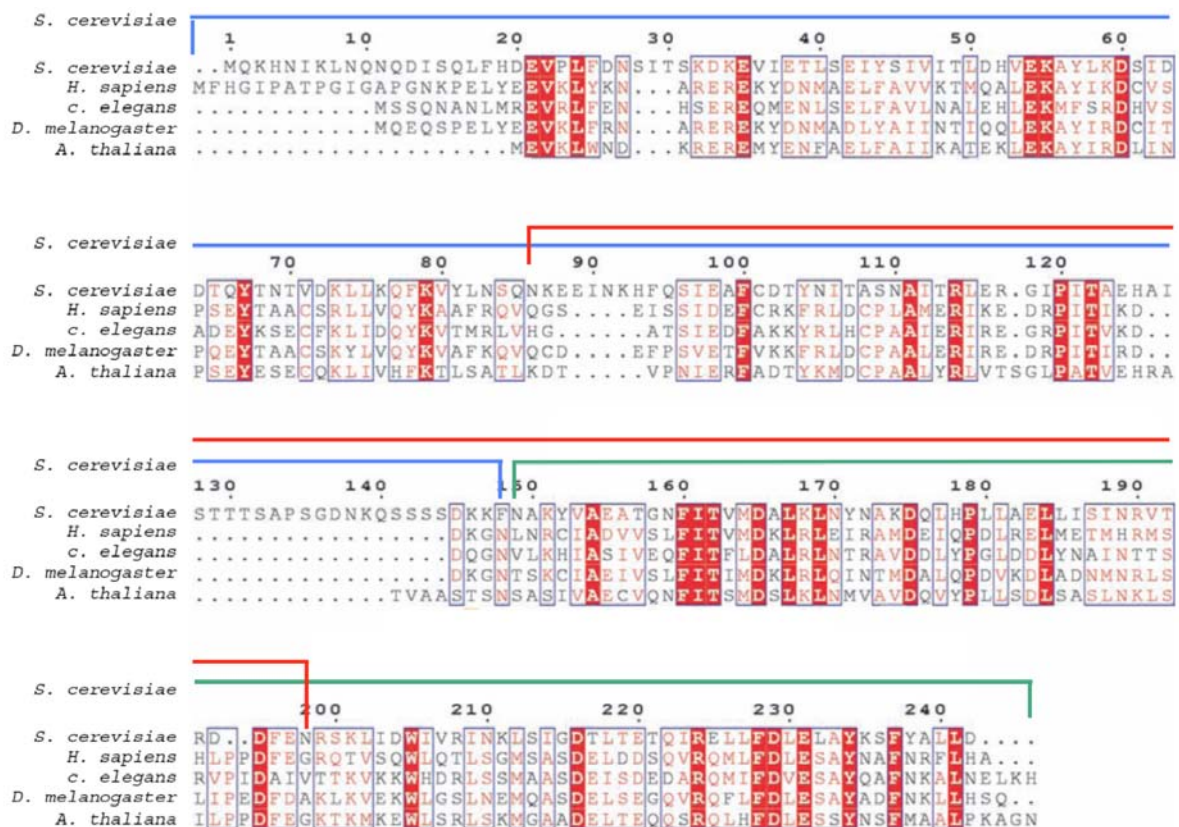


Abbildung 55: Primärsequenz des VPS 28 Proteins. Dargestellt ist ein Alignment der Proteinsequenzen von VPS 28 aus verschiedenen Organismen, wie in der Abbildung bezeichnet. Es sind die Bereiche eingezeichnet, die zur Konstruktion der humanen VPS 28 Fragmente verwendet wurden (siehe 3.2.1.4): blau bezeichnet den N-terminalen Teil aa 2-123, rot den mittleren Teil aa 85-176 und grün den C-terminalen Teil aa 124-221. Die Aminosäure-Angaben beziehen sich auf die humane Sequenz. Aus Pineda-Molina et al. (2006), verändert.

Breakdown by Tissue

Hs.418175

adipose tissue	234	3/12777
adrenal gland	186	6/32215
ascites	24	1/40022
bladder	34	1/29175
blood	125	15/119874
bone	41	3/71667
bone marrow	168	8/47392
brain	65	58/890811
cervix	21	1/47558
cochlea	0	0/16098
colon	104	19/181250
connective tissue	55	8/145437
cranial nerve	0	0/18109
embryonic tissue	66	13/194985
esophagus	52	1/18916
eye	75	15/199696
heart	240	21/87149
kidney	67	14/206123
larynx	123	3/24256
liver	55	11/197800
lung	119	40/333931
lymph	0	0/44428
lymph node	77	7/90609
mammary gland	131	20/151863
mouth	47	3/62897
muscle	75	8/106514
nerve	127	2/15645
ovary	296	30/101128
pancreas	140	30/214089
parathyroid	632	13/20554
pharynx	119	5/41803
pituitary gland	60	1/16586
placenta	67	19/281155
prostate	79	15/189548
salivary gland	0	0/20254
skin	107	20/186159
small intestine	92	4/43311
spleen	178	9/50510
stomach	31	3/95320
testis	71	24/337730
thymus	161	12/74105
thyroid	105	5/47348
tonsil	0	0/17026
trachea	21	1/46887
umbilical cord	73	1/13515
uterus	87	20/228444
vascular	20	1/49597
whole body	162	7/43023
whole brain	52	7/133484

Breakdown by Health State

Hs.418175

adrenal tumor	314	4/12703
bone tumor	120	12/99675
breast (mammary gland) cancer	150	14/93020
cervical tumor	29	1/33938
colorectal cancer	80	9/112359
esophageal tumor	0	0/16386
gastrointestinal tumor	58	7/119030
germ cell tumor	39	10/254527
glioma	93	10/106450
head and neck tumor	75	10/133267
kidney tumor	29	2/67205
leukemia	96	9/93575
liver tumor	34	3/88101
lymphoma	69	5/72121
non-glioma	109	14/128043
non-neoplasia	44	4/90133
normal	96	311/3231433
ovarian tumor	341	26/76097
pancreatic tumor	133	14/104989
prostate tumor	81	9/111050
respiratory tract tumor	183	19/103597
retinoblastoma	64	3/46485
skin tumor	80	10/124880
soft tissue/muscle tissue tumor	47	6/125478
urinary bladder tumor	0	0/26381
uterine tumor	110	10/90251

Breakdown by Developmental Stage

Hs.418175

embryo	77	14/179566
embryoid body	56	4/70535
fetus	126	70/553710
neonate (less than 4 weeks old)	75	2/26593
infant (less than 3 years old)	0	0/21845
juvenile (less than 17 years old)	18	1/53891
adult (17 years old and older)	113	217/1909841

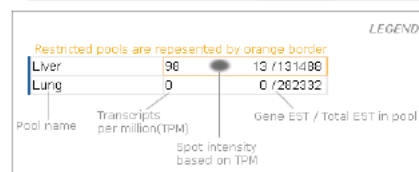


Abbildung 56: Expressionsprofil von VPS 28 im ESTProfile der Datenbank UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.418175>)

Abbildung 56 zeigt das Expressionsprofil von humanem VPS 28 im ESTProfile der Datenbank UniGene (Hs.418175 VPS 28) – Stand IV-2007. Hier ist für eine Anzahl an humanen Geweben der Anteil VPS 28-Transkripte angegeben. VPS 28 wird in vielen Geweben exprimiert, besonders stark in Nebenschilddrüse. Im Vergleich zur Expressionsstärke des gesamten Körpers wird es relativ stark in Ovarien und Herz exprimiert. Die Expression in Blut, Knochenmark, Milz und Thymus entspricht ungefähr dem Körperdurchschnitt. Schwächer wird VPS 28 z.B. in Gehirn exprimiert.

5.3 Abkürzungen

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
aa	Aminosäuren
AIDS	acquired immuno- deficiency syndrome
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides
BLASTp	Basic Local Alignment Search Tool for proteins
BM	BacterioMatch
BSA	Bovine Serum Albumine
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzen
CFP	cyan fluorescent protein
cfu	colony forming units
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT)	Dithiothreitol
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethyleneglycol-bis(b-aminoethyl)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	green fluorescent protein
GLUE	GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45
GTP	Guanosin-Triphosphat
HAART	highly active antiretroviral therapy
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HNE	4-Hydroxynon-2-enal
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactosid
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LTR	Long Terminal Repeat
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NES	Nuclear export signal
NLS	Nuclear localisation signal
NPC	Nuclear pore complex
OD	optische Dichte
ONPG	2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	Rev Response Element
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

5.4 BLAST Analyse

Durch BLAST Analyse wurden die Identitäten der beiden in dieser Arbeit aus einer cDNA-Bibliothek gefundenen neuen Rev-interagierenden Proteine bestimmt, siehe Tabelle 5. Hier sind die Einträge der Nukleotid Datenbank des NCBI wiedergegeben.

GST A4 : Accession number NM_001512

NM_001512. Reports Homo sapiens glut...[gi:23065568]
 LOCUS NM_001512 1317 bp mRNA linear PRI 02-MAR-2005
 DEFINITION Homo sapiens glutathione S-transferase A4 (GSTA4), mRNA.
 ACCESSION NM_001512
 VERSION NM_001512.2 GI:23065568
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini;
 Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1317)
 AUTHORS Engle,M.R., Singh,S.P., Czernik,P.J., Gaddy,D., Montague,D.C.,
 Ceci,J.D., Yang,Y., Awasthi,S., Awasthi,Y.C. and Zimniak,P.
 TITLE Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase
 metabolizing 4-hydroxynonenal: generation and analysis of mGsta4
 null mouse
 JOURNAL Toxicol. Appl. Pharmacol. 194 (3), 296-308 (2004)

- PUBMED 14761685
REMARK GeneRIF: null mice had a significantly lower survival time than wild-type controls when chronically treated with relatively low doses of paraquat, a finding consistent with a role of glutathione transferase A4-4 in the defense against oxidative stress
- REFERENCE 2 (bases 1 to 1317)
AUTHORS Gallagher,E.P. and Gardner,J.L.
TITLE Comparative expression of two alpha class glutathione S-transferases in human adult and prenatal liver tissues
JOURNAL Biochem. Pharmacol. 63 (11), 2025-2036 (2002)
PUBMED 12093480
REMARK GeneRIF: expression of hGSTA1/2 and hGSTA4 steady-state mRNAs in second trimester prenatal livers
- REFERENCE 3 (bases 1 to 1317)
AUTHORS Gustafsson,A., Nilsson,L.O. and Mannervik,B.
TITLE Hybridization of alpha class subunits generating a functional glutathione transferase A1-4 heterodimer
JOURNAL J. Mol. Biol. 316 (2), 395-406 (2002)
PUBMED 11851347
REMARK GeneRIF: ability of the two Alpha class subunit interfaces to adopt a functional heterodimeric structure
- REFERENCE 4 (bases 1 to 1317)
AUTHORS Ketterer,B.
TITLE A bird's eye view of the glutathione transferase field
JOURNAL Chem. Biol. Interact. 138 (1), 27-42 (2001)
PUBMED 11640913
REMARK Review article
- REFERENCE 5 (bases 1 to 1317)
AUTHORS Bruns,C.M., Hubatsch,I., Ridderstrom,M., Mannervik,B. and Tainer,J.A.
TITLE Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products
JOURNAL J. Mol. Biol. 288 (3), 427-439 (1999)
PUBMED 10329152
- REFERENCE 6 (bases 1 to 1317)
AUTHORS Desmots,F., Rauch,C., Henry,C., Guillouzo,A. and Morel,F.
TITLE Genomic organization, 5'-flanking region and chromosomal localization of the human glutathione transferase A4 gene
JOURNAL Biochem. J. 336 (PT 2), 437-442 (1998)
PUBMED 9820822
- REFERENCE 7 (bases 1 to 1317)
AUTHORS Liu,S., Stoesz,S.P. and Pickett,C.B.
TITLE Identification of a novel human glutathione S-transferase using bioinformatics
JOURNAL Arch. Biochem. Biophys. 352 (2), 306-313 (1998)
PUBMED 9587421
- REFERENCE 8 (bases 1 to 1317)
AUTHORS Board,P.G.
TITLE Identification of cDNAs encoding two human alpha class glutathione transferases (GSTA3 and GSTA4) and the heterologous expression of GSTA4-4
JOURNAL Biochem. J. 330 (PT 2), 827-831 (1998)
PUBMED 9480897
- REFERENCE 9 (bases 1 to 1317)
AUTHORS Hubatsch,I., Ridderstrom,M. and Mannervik,B.
TITLE Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation
JOURNAL Biochem. J. 330 (PT 1), 175-179 (1998)
PUBMED 9461507
- COMMENT REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from AF025887.1 and BG716171.1. On Sep 17, 2002 this sequence version replaced gi:4504172.

Summary: Cytosolic and membrane-bound forms of glutathione S-transferase are encoded by two distinct supergene families. These enzymes are involved in cellular defense against toxic, carcinogenic, and pharmacologically active electrophilic compounds. At present, eight distinct classes of the soluble cytoplasmic mammalian glutathione S-transferases have been identified: alpha, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta and zeta. This gene encodes a glutathione S-transferase belonging to the alpha class. The alpha class genes, which are located in a cluster on chromosome 6, are highly related and encode enzymes with glutathione peroxidase

activity that function in the detoxification of lipid peroxidation products. Reactive electrophiles produced by oxidative metabolism have been linked to a number of degenerative diseases including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, cataract formation, and atherosclerosis.

COMPLETENESS: complete on the 3' end.

```

FEATURES             Location/Qualifiers
source               1..1317
                    /organism="Homo sapiens"
                    /mol_type="mRNA"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /chromosome="6"
                    /map="6p12.1"
gene                 1..1317
                    /gene="GSTA4"
                    /note="synonyms: GTA4, GSTA4-4"
                    /db_xref="GeneID:2941"
                    /db_xref="MIM:605450"
CDS                  113..781
                    /gene="GSTA4"
                    /EC_number="2.5.1.18"
                    /note="glutathione S-alkyltransferase A4; glutathione
                    S-aryltransferase A4; S-(hydroxyalkyl)glutathione lyase
                    A4; glutathione S-aralkyltransferase A4; glutathione
                    transferase A4-4; GST class-alpha; glutathione
                    S-transferase, alpha 4;
                    go_function: transferase activity [goid 0016740] [evidence
                    IEA];
                    go_function: glutathione transferase activity [goid
                    0004364] [evidence TAS] [pmid 9480897];
                    go_process: metabolism [goid 0008152] [evidence IEA];
                    go_process: response to stress [goid 0006950] [evidence
                    NR]"
                    /codon_start=1
                    /product="glutathione S-transferase A4"
                    /protein_id="NP_001503.1"
                    /db_xref="GI:4504173"
                    /db_xref="CCDS:CCDS4948.1"
                    /db_xref="GeneID:2941"
                    /db_xref="MIM:605450"
                    /translation="MAARPKLHYPNGRGRMESVRWVLAAGVFEDEFLETKEQLYKL
                    QDGNHLLFQQVPMVEIDGMKLVQTRSILHYIADKHNLFGKNLKERLIDMYVEGTLDL
                    LELLIMHPFLKDDQKQEVNMAQKAIIRYFPVFEEKILRGHGQSFLVGNQLSLADVIL
                    LQTLALEEKIPNILSAFPFLQEYTVKLSNIPTIKRFLEPGSKKKPPDEIYVRTVYN
                    IFRP"
polyA_signal         1277..1282
                    /gene="GSTA4"
polyA_site            1298
                    /gene="GSTA4"
                    /evidence=experimental

```

ORIGIN

```

1 agctcgcg cgctagagcc gcctgctggt ctcaccagc cgggaccgct gacctggcgc
61 ttgtgcggc tccaggcctc cagtggaact ccagaaagcc tgaaaagcta tcatggcagc
121 aaggccaag cccactatc ccaacggaag aggccggatg gagtccgtga gatgggttt
181 agctgccgc ggagtcgagt ttgatgaaga atttctgaa acaaaagaac agttgtaca
241 gttcaggat ggaaccacc tgcgttcca acaagtccc atggtgaaa ttgacgggat
301 gaagtggta cagaccgaa gcatttcca ctacatagca gacaagcaca atctcttgg
361 caagaacctc aaggagagaa ccctgattga catgtactgt gaggggacac tggatctgct
421 ggaactgctt atcatgcatc tttctttaa accagatgat cagcaaaagg aagtggftaa
481 catggcccag aaggctataa ttagatactt tctgtggtt gaaaagattt taaggggtca
541 cggcaaaagc tttctgttg gtaatcagct gagccttga gatgtgattt tactccaaac
601 catttagct ctagaagaga aaattcctaa taccctgtct gcatttctt tctccagga
661 atacacagtg aaactaagta atatccctac aattaagaga ttccttgaac ctggcagcaa
721 gaagaagcct cccctgatg aaattatgt gagaaccgtc tacaacatc ttaggccata
781 aaacaacaca tccatgtgtg agtgacagtg tgttctaga gatggtattg tctacagta
841 tctcttaag gatcccagct ctgtcatggt gctatctatg tattaagttg ggtcctaagt
901 tgggtctttt gtgtcaacga gatcatctct tctagaata tcaacctttt ttgtccagta
961 aataatggtt aggggatctt tattgaaaa ctttttggg gaggctggtt ttaagttag
1021 atctgattgg gctactcatg tctgtagcc agtcatcctc cataataaga atggcgagga
1081 tctctgttc tctctgagt gctcttctac tctctgagc gctcttctgc tctcttctac
1141 ctgtctctt atccttacc ctccagctct ctgctaatt tttagtgtt aataacaacc
1201 gaatgtctag taaatgactc tctctgagc tgaataaat aaaatggtag taatgaatc
1261 aatcagtatt agccaaaata aagaattat gagtcattaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

VPS 28: Accession number NM_016208

LOCUS NM_016208 1065 bp mRNA linear PRI 02-MAR-2007
DEFINITION Homo sapiens vacuolar protein sorting 28 homolog (S. cerevisiae)
(VPS28), transcript variant 1, mRNA.
ACCESSION NM_016208
VERSION NM_016208.2 GI:34452691
KEYWORDS .
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1065)
AUTHORS Hui,E.K., Barman,S., Tang,D.H., France,B. and Nayak,D.P.
TITLE YRKL sequence of influenza virus M1 functions as the L domain motif
and interacts with VPS28 and Cdc42
JOURNAL J. Virol. 80 (5), 2291-2308 (2006)
PUBMED 16474136
REMARK GeneRIF: results indicated that VPS28 and Cdc42 are associated with
the influenza A virus M1 protein and are involved in the influenza
virus life cycle.
Retracted:[Hui EK, Barman S, Yang TY, Tang DH, France B, Nayak DP.
J Virol. 2006 Oct;80(20):10289. PMID: 17005709]
REFERENCE 2 (bases 1 to 1065)
AUTHORS Eastman,S.W., Martin-Serrano,J., Chung,W., Zang,T. and
Bieniasz,P.D.
TITLE Identification of human VPS37C, a component of endosomal sorting
complex required for transport-I important for viral budding
JOURNAL J. Biol. Chem. 280 (1), 628-636 (2005)
PUBMED 15509564
REFERENCE 3 (bases 1 to 1065)
AUTHORS Bache,K.G., Slagsvold,T., Cabezas,A., Rosendal,K.R., Raiborg,C. and
Stenmark,H.
TITLE The growth-regulatory protein HCRP1/hVps37A is a subunit of
mammalian ESCRT-I and mediates receptor down-regulation
JOURNAL Mol. Biol. Cell 15 (9), 4337-4346 (2004)
PUBMED 15240819
REFERENCE 4 (bases 1 to 1065)
AUTHORS Raiborg,C., Rusten,T.E. and Stenmark,H.
TITLE Protein sorting into multivesicular endosomes
JOURNAL Curr. Opin. Cell Biol. 15 (4), 446-455 (2003)
PUBMED 12892785
REMARK Review article
REFERENCE 5 (bases 1 to 1065)
AUTHORS Tanzi,G.O., Piefer,A.J. and Bates,P.
TITLE Equine infectious anemia virus utilizes host vesicular protein
sorting machinery during particle release
JOURNAL J. Virol. 77 (15), 8440-8447 (2003)
PUBMED 12857913
REMARK GeneRIF: EIAV Gag interacts with a cellular component of the VPS
machinery, VPS28, to accomplish efficient particle release
REFERENCE 6 (bases 1 to 1065)
AUTHORS Martin-Serrano,J., Zang,T. and Bieniasz,P.D.
TITLE Role of ESCRT-I in retroviral budding
JOURNAL J. Virol. 77 (8), 4794-4804 (2003)
PUBMED 12663786
REFERENCE 7 (bases 1 to 1065)
AUTHORS Bishop,N., Horman,A. and Woodman,P.
TITLE Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the
removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates
JOURNAL J. Cell Biol. 157 (1), 91-101 (2002)
PUBMED 11916981
REMARK GeneRIF: recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal
protein-ubiquitin conjugates.
REFERENCE 8 (bases 1 to 1065)
AUTHORS Suzuki,H., Fukunishi,Y., Kagawa,I., Saito,R., Oda,H., Endo,T.,
Kondo,S., Bono,H., Okazaki,Y. and Hayashizaki,Y.
TITLE Protein-protein interaction panel using mouse full-length cDNAs
JOURNAL Genome Res. 11 (10), 1758-1765 (2001)
PUBMED 11591653

REFERENCE 9 (bases 1 to 1065)

AUTHORS Bishop,N. and Woodman,P.

TITLE TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes

JOURNAL J. Biol. Chem. 276 (15), 11735-11742 (2001)

PUBMED 11134028

COMMENT REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from AK026865.1 and BU658837.1. On Sep 4, 2003 this sequence version replaced gi:7705884.

Summary: This gene encodes a protein involved in endosomal sorting of cell surface receptors via a multivesicular body/late endosome pathway. The encoded protein is one of the three subunits of the ESCRT-I complex (endosomal complexes required for transport) involved in the sorting of ubiquitinated proteins. The two other subunits of ESCRT-I are vesicular protein sorting 23, also known as tumor susceptibility gene 101 (TSG101), and vesicular protein sorting 37. Two alternative transcripts encoding different isoforms have been described. Additional alternative transcripts may exist but the proteins encoded by these transcripts have not been verified experimentally.

Transcript Variant: This variant (1) encodes the predominant isoform (1).

COMPLETENESS: complete on the 3' end.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1065
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="8"
 /map="8q24.3"

gene 1..1065
 /gene="VPS28"
 /note="vacuolar protein sorting 28 homolog (S. cerevisiae); synonym: MGC60323"
 /db_xref="GeneID:51160"
 /db_xref="HGNC:18178"
 /db_xref="HPRD:11675"

CDS 91..756
 /gene="VPS28"
 /GO_component="cytosol [pmid 11134028]; endosome [pmid 11134028]"
 /GO_function="protein binding [pmid 11134028]"
 /GO_process="protein transport"
 /note="isoform 1 is encoded by transcript variant 1; yeast class E protein Vps28p homolog"
 /codon_start=1
 /product="vacuolar protein sorting 28 isoform 1"
 /protein_id="NP_057292.1"
 /db_xref="GI:7705885"
 /db_xref="CCDS:CCDS6425.1"
 /db_xref="GeneID:51160"
 /db_xref="HGNC:18178"
 /db_xref="HPRD:11675"
 /translation="MFHGIPATPGIGAPGNKPELYEEVKLYKNAREREKYDNMAELFA
 VVKTMQALEKAYIKDCVSPSEYTAACSRLLVQYKAAFRQVQGSEISSIDEFCRKFRLLD
 CPLAMERIKEDRPITIKDDKGNLNRCIADVVSFLFITVMDKLRLEIRAMDEIQPDLREL
 METMHRMSHLPPDFEGRQTVSQWLQTLSGMSASDELDDSQVRQMLFDLESAYNAFNRF
 LHA"

STS 242..362
 /gene="VPS28"
 /standard_name="MARC_23623-23624:1027527533:1"
 /db_xref="UniSTS:268725"

STS 713..852
 /gene="VPS28"
 /standard_name="RH16000"
 /db_xref="UniSTS:88627"

STS 840..940
 /gene="VPS28"
 /standard_name="A006J21"
 /db_xref="UniSTS:57306"

polyA_signal 922..927
 /gene="VPS28"

polyA_site 939

```

      /gene="VPS28"
polyA_site 944
      /gene="VPS28"
ORIGIN
1  cgctgaccga ggcacccccg cccccggcgc catcttcccg accgcgagcc gtccaggtct
61  cagtgtgtg cccccccag agcctagagg atgttcatg ggateccagc cagccgggc
121  ataggagccc ctgggaacaa gccggagctg tatgaggaag tgaagtgtg caagaacgcc
181  cgggagagg agaagtacga caacatgca gagctgttg cgtgtgtgaa gacaatgcaa
241  gccctggaga aggcctacat caaggactgt gtctcccca gcgagtacac tgcagcctgc
301  tcccggctcc tggccaata caaagctgcc ttcaggcagg tccagggtc agaatacagc
361  tctattgacg aattctgccg caagtccgc ctggactgcc cgctggccat ggagcggatc
421  aaggagacc ggcccatcac catcaaggac gacaaggcca acctcaaccg ctgcatcgca
481  gactgtgtct cgtcttcat cacggtcatg gacaagctgc gcctggagat ccgcgccatg
541  gatgagatcc agcccgaact gcgagagctg atggagacca tgcaccgcac gagccacctc
601  ccaccgact ttagggccg ccagacggtc agccagtggc tgcagacct gagcggcatg
661  tcggctcagc atgagctgga cgactcacag gtgcctcaga tgccttcca cctggagtca
721  gcctacaacg cttcaaccg cttcctcat gcctgagccc ggggcactag ccctgcaca
781  gaagggcaga gtctgaggcg atggctcctg gtcccctgtc cgcacacag gccgtgtgca
841  tccacacaac tcactgtctg cagctgcctg tctgtgtct gtcttgggtc tcagaactt
901  gggggccggg cccctccca caataaagat gctctccgac cttcaaaaa aaaaaaaaaa
961  aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1021 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

5.5 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Verlaufs einer HIV-Infektion.....	9
Abbildung 2: Organisation des proviralen Genoms von HIV-1 (A) und Organisation des HIV Virus Partikels (B).....	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV.....	13
Abbildung 4: Transport des Rev-Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma.	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänen des Rev-Proteins.....	18
Abbildung 6: Vorausgesagte Sekundärstruktur des Rev-Proteins.	19
Abbildung 7: Struktur der RRE (Rev response element).....	20
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs beim Klonieren mit dem BD In-Fusion PCR Cloning Kit.	46
Abbildung 9: Übersicht über das bakterielle Zwei-Hybrid-System BacterioMatch von Stratogene.	60
Abbildung 10: Reportergene des BacterioMatch I Systems.	61
Abbildung 11: Reportergene des BacterioMatch II Systems.	62
Abbildung 12: Schematischer Ablauf der Konstruktion der cDNA-Bibliothek von Stratogene.....	63
Abbildung 13: Schematischer Ablauf der Identifizierung und Charakterisierung neuer Rev-interagierender Proteine.....	67
Abbildung 14: Expression von λ cl-Rev (von pBT-Rev) und RNAP α -Rev (von pTRG-Rev) im bakteriellen System.....	69
Abbildung 15: β -Galactosidase-Reporteraktivität (ausgedrückt in Miller Units) für die Rev-Rev-Positivkontrolle und Negativkontrollen.....	70
Abbildung 16: Schematischer Ablauf des Library-Screenings.	78
Abbildung 17: Beispiel für die Restriktionsanalyse der isolierten pTRG-cDNA Plasmide.	80
Abbildung 18: Interaktionsstärken der Faktoren B1-1 und B2-92 mit Rev.....	84
Abbildung 19: Interaktionsstärken von B1-1 und dem korrespondierenden Protein voller Länge GST A4 mit Rev.	85

Abbildung 20: Interaktionsstärken von B2-92 und dem korrespondierenden Protein voller Länge VPS 28 mit Rev.	85
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Rev-Proteins und der verwendeten Rev-Fragmente.	87
Abbildung 22: Interaktionsstärken von Rev und den beiden Faktoren B1-1 und B2-92 mit unterschiedlichen Bereichen in Rev.	88
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Fragmente des B1-1 Proteins, die auf Interaktion mit Rev untersucht wurden, vgl. Abbildung 37.	90
Abbildung 24: Interaktionsstärken von drei verschiedenen Fragmenten des Proteins B1-1 mit Rev.	91
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Fragmente des VPS 28 Proteins, die auf Interaktion mit Rev untersucht wurden, vgl. Abbildung 55.	92
Abbildung 26: Interaktionsstärken von verschiedenen Fragmenten des Proteins VPS 28 mit Rev.	93
Abbildung 27: Untersuchung der Fähigkeit zur Dimer-Bildung von B1-1.	95
Abbildung 28: Untersuchung der Co-Lokalisation von Rev mit den neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren.	98
Abbildung 29: Schematische Darstellung des Ablaufs der Co-Immunopräzipitation.	101
Abbildung 30: Westernblot der Co-Immunopräzipitation von Rev und den neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren.	102
Abbildung 32: Schematische Darstellung des Ablaufs der Diskussion.	108
Abbildung 33: Schematische Darstellung der mRNA-Bereiche, die in der cDNA-Bibliothek repräsentiert sind.	115
Abbildung 34: Illustration der Toxizität anhand des Bakterienwachstums nach unterschiedlich starker Induktion der Expression von Bait und Target durch verschiedene IPTG-Konzentrationen.	117
Abbildung 35: Vereinfachte schematische Darstellung verschiedener Aspekte der bakteriellen Transkriptionsaktivierung.	119
Abbildung 36: Dreidimensionale Struktur von GST A4 und B1-1.	124
Abbildung 37: Illustration der Fragmente von GST A4, die auf Interaktion mit Rev getestet wurden.	126
Abbildung 38: Mögliche Konsequenzen der Interaktion zwischen Rev und VPS 28.	131
Abbildung 39 Mögliche Konsequenzen der Interaktion zwischen Rev und einem N-terminalen Fragment von VPS 28 („Nt-VPS 28“).	135
Abbildung 40: Allgemeine Darstellung der Reaktion, die von Glutathion-S-Transferasen katalysiert wird.	I
Abbildung 41: Rolle der Glutathion-S-Transferasen A1, A2 und A4 bei der Beseitigung der Produkte der Oxidation von Fettsäuren.	III
Abbildung 42: Genomische Organisation des humanen GST Alpha Gen clusters auf Chromosom 6p12.1 - p12.2.	III
Abbildung 43: Alignment der Aminosäure-Sequenzen der Mitglieder der GST Alpha-Klasse.	IV
Abbildung 44: Expressionsprofil von hGST A4 im ESTProfile der Datenbank UniGene.	V
Abbildung 45: Primär- und Sekundärstruktur des GST A4 Proteins.	VI
Abbildung 46: Die drei für die Substrat-Spezifität verantwortlichen hydrophoben Module in hGST A4 und hGST A1.	VIII
Abbildung 47: Für die Aktivierung des Glutathions wichtige Aminosäuren bei GST A4.	IX
Abbildung 49: Schematische Darstellung des Sorting ubiquitinierten Membran-Proteinen in MVEs (multivesikular Endosomes) und Degradierung im Lysosom.	XIV

Abbildung 50: Schematische Darstellung des ESCRT-I Komplexes (enthält VPS 28) und des ESCRT-II Komplexes.	XV
Abbildung 51: Ablauf des sorting von ubiquitinierten Proteinen in Vesikel durch die ESCRT-Maschinerie.	XVI
Abbildung 52: Darstellung des ESCRT-I core.	XVII
Abbildung 53: Parallelen zwischen dem sorting ubiquitiniertes Membranproteine via MVB pathway und viralem Budding.	XVIII
Abbildung 54: Gebrauch der ESCRT Maschinerie durch Viren.	XIX
Abbildung 55: Primärsequenz von VPS 28.	XX
Abbildung 56: Expressionsprofil von VPS 28 im ESTProfile der Datenbank UniGene	XXI

5.6 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Klassifizierung der klinischen Phasen einer HIV-Infektion nach den Richtlinien des CDC 1992 der USA.	9
Tabelle 2: Auswirkung verschiedener IPTG- und 3-AT-Konzentrationen auf den zu erwartenden Anteil falsch positiver Kolonien.	72
Tabelle 3: Genaue Bestimmung der mit den im Library-Screening verwendeten Agarplatten zu erwartenden falsch Positiven.	74
Tabelle 4: Überprüfung der B1-Kolonien auf spezifische Interaktion mit pBT-Rev.	79
Tabelle 5: Wichtige Daten der neu identifizierten Rev-Interaktoren.	82
Tabelle 6: Quantifizierung der Untersuchung der Co-Lokalisation mit den neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren.	99
Tabelle 7: Relative zytotoxische Wirkung der Faktoren B1-1 und B2-92 und des Rev-Proteins auf HeLa Zellen, gemessen mit dem CytoTox-ONE Assay (Promega).	105
Tabelle 8: Aminosäuren, die an der Bildung der Bindestellen für Glutathion (GTA) und des elektrophilen Substrats (HTA) der humanen Glutathion-S-Transferase A4 beteiligt sind.	VII
Tabelle 9: Orthologe der ESCRT-Proteine und akzessorischer Proteine in Hefe, Mensch, Fruchtfliege und Nematoden.	XIII

5.7 Literatur

- Abe, K. and N. Matsuki (2000). "Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT." *Neurosci Res* **38**(4): 325-9.
- Adamson, C. S. and I. M. Jones (2004). "The molecular basis of HIV capsid assembly--five years of progress." *Rev Med Virol* **14**(2): 107-21.
- Allardyce, C. S., P. D. McDonagh, et al. (1999). "The role of tyrosine-9 and the C-terminal helix in the catalytic mechanism of Alpha-class glutathione S-transferases." *Biochem J* **343 Pt 3**: 525-31.
- Armstrong, R. N. (1997). "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases." *Chem Res Toxicol* **10**(1): 2-18.

- Auer, M., H. U. Gremlich, et al. (1994). "Helix-loop-helix motif in HIV-1 Rev." *Biochemistry* **33**(10): 2988-96.
- Awasthi, Y. C., Y. Yang, et al. (2004). "Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases." *Free Radic Biol Med* **37**(5): 607-19.
- Babbitt, P. C. (2000). "Reengineering the glutathione S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10298-300.
- Babst, M. (2006). "A close-up of the ESCRTs." *Dev Cell* **10**(5): 547-8.
- Babst, M., D. J. Katzmann, et al. (2002). "Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting." *Dev Cell* **3**(2): 271-82.
- Babst, M., D. J. Katzmann, et al. (2002). "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." *Dev Cell* **3**(2): 283-9.
- Bache, K. G., A. Brech, et al. (2003). "Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes." *J Cell Biol* **162**(3): 435-42.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-71.
- Battiste, J. L., H. Mao, et al. (1996). "Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex." *Science* **273**(5281): 1547-51.
- Berkowitz, R., J. Fisher, et al. (1996). "RNA packaging." *Curr Top Microbiol Immunol* **214**: 177-218.
- Bevec, D., M. Dobrovnik, et al. (1992). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev trans-activator." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20): 9870-4.
- Bevec, D., H. Jaksche, et al. (1996). "Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A." *Science* **271**(5257): 1858-60.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Bischoff, F. R. and D. Gorlich (1997). "RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors." *FEBS Lett* **419**(2-3): 249-54.
- Bishop, N., A. Horman, et al. (2002). "Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates." *J Cell Biol* **157**(1): 91-101.
- Bishop, N. and P. Woodman (2000). "ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking." *Mol Biol Cell* **11**(1): 227-39.
- Biti, R., R. French, et al. (1997). "HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele." *Nat Med* **3**(3): 252-3.
- Board, P. G. (1998). "Identification of cDNAs encoding two human alpha class glutathione transferases (GSTA3 and GSTA4) and the heterologous expression of GSTA4-4." *Biochem J* **330** (Pt 2): 827-31.
- Bogerd, H. P., A. Echarri, et al. (1998). "Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1." *J Virol* **72**(11): 8627-35.
- Bonyhadi, M. L., K. Moss, et al. (1997). "RevM10-expressing T cells derived in vivo from transduced human hematopoietic stem-progenitor cells inhibit human immunodeficiency virus replication." *J Virol* **71**(6): 4707-16.
- Brack-Werner, R. (1999). "Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis." *Aids* **13**(1): 1-22.

- Brack-Werner, R. and J. E. Bell (1999). "Replication of HIV-1 in human astrocytes." Neuro-AIDS 2(8).
- Brinkman, K., J. A. Smeitink, et al. (1999). "Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy." Lancet 354(9184): 1112-5.
- Broder, S. and R. C. Gallo (1984). "A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS." N Engl J Med 311(20): 1292-7.
- Brunner, K. T., J. Mael, et al. (1968). "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs." Immunology 14(2): 181-96.
- Bruns, C. M., I. Hubatsch, et al. (1999). "Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products." J Mol Biol 288(3): 427-39.
- Bukrinskaya, A. (2007). "HIV-1 matrix protein: a mysterious regulator of the viral life cycle." Virus Res 124(1-2): 1-11.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem 112(2): 195-203.
- Busby, S. and R. H. Ebright (1999). "Transcription activation by catabolite activator protein (CAP)." J Mol Biol 293(2): 199-213.
- Chan, D. C., D. Fass, et al. (1997). "Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein." Cell 89(2): 263-73.
- Charpentier, B., F. Stutz, et al. (1997). "A dynamic in vivo view of the HIV-I Rev-RRE interaction." J Mol Biol 266(5): 950-62.
- Chen, J. D., X. Bai, et al. (1997). "Inactivation of HIV-1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy." Nat Med 3(10): 1110-6.
- Chen, L. F., J. Hoy, et al. (2007). "Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection." Med J Aust 186(3): 146-51.
- Chun, T. W., L. Carruth, et al. (1997). "Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection." Nature 387(6629): 183-8.
- Cimarelli, A. and J. L. Darlix (2002). "Assembling the human immunodeficiency virus type 1." Cell Mol Life Sci 59(7): 1166-84.
- Clague, M. J. and S. Urbe (2003). "Hrs function: viruses provide the clue." Trends Cell Biol 13(12): 603-6.
- Clavel, F. and A. J. Hance (2004). "HIV drug resistance." N Engl J Med 350(10): 1023-35.
- Coburn, G. A. and B. R. Cullen (2002). "Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference." J Virol 76(18): 9225-31.
- Cochrane, A. W., E. Golub, et al. (1989). "Functional significance of phosphorylation to the human immunodeficiency virus Rev-Protein." J Virol 63(10): 4438-40.
- Cole, J. L., J. D. Gehman, et al. (1993). "Solution oligomerization of the Rev-Protein of HIV-1: implications for function." Biochemistry 32(44): 11769-75.
- Conibear, E. (2002). "An ESCRT into the endosome." Mol Cell 10(2): 215-6.
- Console, S., C. Marty, et al. (2003). "Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans." J Biol Chem 278(37): 35109-14.
- Cullen, B. R. (1998). "Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways." Virology 249(2): 203-10.

- Cullen, B. R., J. Hauber, et al. (1988). "Subcellular localization of the human immunodeficiency virus trans-acting art gene product." *J Virol* **62**(7): 2498-501.
- Curtiss, M., C. Jones, et al. (2007). "Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12." *Mol Biol Cell* **18**(2): 636-45.
- Daar, E. S., X. L. Li, et al. (1990). "High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(17): 6574-8.
- Daelemans, D., S. V. Costes, et al. (2004). "In vivo HIV-1 Rev multimerization in the nucleolus and cytoplasm identified by fluorescence resonance energy transfer." *J Biol Chem* **279**(48): 50167-75.
- Daly, T. J., K. S. Cook, et al. (1989). "Specific binding of HIV-1 recombinant Rev-Protein to the Rev-responsive element in vitro." *Nature* **342**(6251): 816-9.
- de Mendoza, C., O. Gallego, et al. (2002). "Mechanisms of resistance to antiretroviral drugs--clinical implications." *AIDS Rev* **4**(2): 64-82.
- Decker, T. and M. L. Lohmann-Matthes (1988). "A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity." *J Immunol Methods* **115**(1): 61-9.
- Demirov, D. G. and E. O. Freed (2004). "Retrovirus budding." *Virus Res* **106**(2): 87-102.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." *Nature* **381**(6584): 661-6.
- Desmots, F., C. Rauch, et al. (1998). "Genomic organization, 5'-flanking region and chromosomal localization of the human glutathione transferase A4 gene." *Biochem J* **336** (Pt 2): 437-42.
- Dirr, H. W. and L. A. Wallace (1999). "Role of the C-terminal helix 9 in the stability and ligandin function of class alpha glutathione transferase A1-1." *Biochemistry* **38**(47): 15631-40.
- Dove, S. L. and A. Hochschild (1998). "Conversion of the omega subunit of Escherichia coli RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target." *Genes Dev* **12**(5): 745-54.
- Dove, S. L., J. K. Joung, et al. (1997). "Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts." *Nature* **386**(6625): 627-30.
- Dragic, T., V. Litwin, et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." *Nature* **381**(6584): 667-73.
- Drake, J. W. (1993). "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 4171-5.
- Duan, L., O. Bagasra, et al. (1994). "Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 5075-9.
- Dupre, S. and R. Haguener-Tsapis (2001). "Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase." *Mol Cell Biol* **21**(14): 4482-94.
- Dwivedi, S., R. Sharma, et al. (2006). "The course of CCl4 induced hepatotoxicity is altered in mGSTA4-4 null (-/-) mice." *Toxicology* **218**(1): 58-66.
- Ebright, R. H. and S. Busby (1995). "The Escherichia coli RNA polymerase alpha subunit: structure and function." *Curr Opin Genet Dev* **5**(2): 197-203.
- Engle, M. R., S. P. Singh, et al. (2004). "Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase metabolizing 4-hydroxynonenal: generation and analysis of mGsta4 null mouse." *Toxicol Appl Pharmacol* **194**(3): 296-308.

- Eron, J. J., Jr. (2000). "HIV-1 protease inhibitors." *Clin Infect Dis* **30 Suppl 2**: S160-70.
- Fankhauser, C., E. Izaurralde, et al. (1991). "Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element." *Mol Cell Biol* **11**(5): 2567-75.
- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." *Science* **272**(5263): 872-7.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* **340**(6230): 245-6.
- Fischer, U., S. Meyer, et al. (1994). "Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA." *Embo J* **13**(17): 4105-12.
- Fischl, M. A., D. D. Richman, et al. (1987). "The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial." *N Engl J Med* **317**(4): 185-91.
- Fornerod, M., M. Ohno, et al. (1997a). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." *Cell* **90**(6): 1051-60.
- Fornerod, M., J. van Deursen, et al. (1997b). "The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88." *Embo J* **16**(4): 807-16.
- Frankel, A. D. and J. A. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." *Annu Rev Biochem* **67**: 1-25.
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, et al. (1984). "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS." *Science* **224**(4648): 500-3.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 865-7.
- Gao, F., E. Bailes, et al. (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes." *Nature* **397**(6718): 436-41.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, et al. (2001). "Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding." *Cell* **107**(1): 55-65.
- Gill, D. J., H. Teo, et al. (2007). "Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking." *Embo J* **26**(2): 600-12.
- Gillooly, D. J., C. Raiborg, et al. (2003). "Phosphatidylinositol 3-phosphate is found in microdomains of early endosomes." *Histochem Cell Biol* **120**(6): 445-53.
- Gojobori, T., E. N. Moriyama, et al. (1990). "Evolutionary origin of human and simian immunodeficiency viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(11): 4108-11.
- Gomez, C. and T. J. Hope (2005). "The ins and outs of HIV replication." *Cell Microbiol* **7**(5): 621-6.
- Gourse, R. L., W. Ross, et al. (2000). "UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition." *Mol Microbiol* **37**(4): 687-95.
- Grosjean, H. and W. Fiers (1982). "Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon- anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes." *Gene* **18**(3): 199-209.
- Gullapalli, A., B. L. Wolfe, et al. (2006). "An essential role for SNX1 in lysosomal sorting of protease-activated receptor-1: evidence for retromer-, Hrs-, and Tsg101-independent functions of sorting nexins." *Mol Biol Cell* **17**(3): 1228-38.
- Gustafsson, A., L. O. Nilsson, et al. (2002). "Hybridization of alpha class subunits generating a functional glutathione transferase A1-4 heterodimer." *J Mol Biol* **316**(2): 395-406.

- Guyader, M., M. Emerman, et al. (1987). "Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2." Nature **326**(6114): 662-9.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, et al. (2000). "AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications." Science **287**(5453): 607-14.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Hauber, I., D. Bevec, et al. (2005). "Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy." J Clin Invest **115**(1): 76-85.
- Havlin, R. H., F. J. Blanco, et al. (2007). "Constraints on protein structure in HIV-1 Rev and Rev-RNA supramolecular assemblies from two-dimensional solid state nuclear magnetic resonance." Biochemistry **46**(11): 3586-93.
- Hayes, J. D., J. U. Flanagan, et al. (2005). "Glutathione transferases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 51-88.
- Heaphy, S., J. T. Finch, et al. (1991). "Human immunodeficiency virus type 1 regulator of virion expression, rev, forms nucleoprotein filaments after binding to a purine-rich "bubble" located within the rev-responsive region of viral mRNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7366-70.
- Heguy, A. (1997). "Inhibition of the HIV Rev transactivator : a new target for therapeutic intervention." Front Biosci **2**: d283-97.
- Hemelaar, J., E. Gouws, et al. (2006). "Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004." Aids **20**(16): W13-23.
- Henikoff, S. and J. G. Henikoff (1992). "Amino acid substitution matrices from protein blocks." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10915-9.
- Hicke, L. (2001). "A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin." Cell **106**(5): 527-30.
- Hierro, A., J. Sun, et al. (2004). "Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex." Nature **431**(7005): 221-5.
- Hirsch, V. M., P. Edmondson, et al. (1989). "SIV adaptation to human cells." Nature **341**(6243): 573-4.
- Hochschild, A. and S. L. Dove (1998). "Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription." Cell **92**(5): 597-600.
- Hope, T. J., D. McDonald, et al. (1990). "Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: essential residues near the amino terminus." J Virol **64**(11): 5360-6.
- Hu, J. C., M. G. Kornacker, et al. (2000). "*Escherichia coli* one- and two-hybrid systems for the analysis and identification of protein-protein interactions." Methods **20**(1): 80-94.
- Hubatsch, I., M. Ridderstrom, et al. (1998). "Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation." Biochem J **330** (Pt 1): 175-9.
- Hurley, J. H. and S. D. Emr (2006). "The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network." Annu Rev Biophys Biomol Struct **35**: 277-98.
- Izaurralde, E., U. Kutay, et al. (1997). "The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus." Embo J **16**(21): 6535-47.
- Jacque, J. M., A. Mann, et al. (1998). "Modulation of HIV-1 infectivity by MAPK, a virion-associated kinase." Embo J **17**(9): 2607-18.
- Jain, C. and J. G. Belasco (2001). "Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants." Mol Cell **7**(3): 603-14.

- Joung, J. K. (2001). "Identifying and modifying protein-DNA and protein-protein interactions using a bacterial two-hybrid selection system." *J Cell Biochem Suppl* **37**: 53-7.
- Joung, J. K., E. I. Ramm, et al. (2000). "A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 7382-7.
- Kaplan, W., P. Husler, et al. (1997). "Conformational stability of pGEX-expressed *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase: a detoxification enzyme and fusion-protein affinity tag." *Protein Sci* **6**(2): 399-406.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, et al. (2002). "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 893-905.
- Katzmann, D. J., C. J. Stefan, et al. (2003). "Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting." *J Cell Biol* **162**(3): 413-23.
- Kendig, D. M. and J. B. Tarloff (2007). "Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: implications for in vitro toxicology studies." *Toxicol In Vitro* **21**(1): 125-32.
- Kjems, J. and P. Askjaer (2000). "Rev-Protein and its cellular partners." *Adv Pharmacol* **48**: 251-98.
- Kleber-Janke, T. and W. M. Becker (2000). "Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage." *Protein Expr Purif* **19**(3): 419-24.
- Kolegraff, K., P. Bostik, et al. (2006). "Characterization and role of lentivirus-associated host proteins." *Exp Biol Med (Maywood)* **231**(3): 252-63.
- Kolobe, D., Y. Sayed, et al. (2004). "Characterization of bromosulphophthalein binding to human glutathione S-transferase A1-1: thermodynamics and inhibition kinetics." *Biochem J* **382**(Pt 2): 703-9.
- Korzeniewski, C. and D. M. Callewaert (1983). "An enzyme-release assay for natural cytotoxicity." *J Immunol Methods* **64**(3): 313-20.
- Kostelansky, M. S., J. Sun, et al. (2006). "Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex." *Cell* **125**(1): 113-26.
- Lamothe, B. and S. Joshi (2000). "Current developments and future prospects for HIV gene therapy using interfering RNA-based strategies." *Front Biosci* **5**: D527-55.
- Langelier, C., U. K. von Schwedler, et al. (2006). "Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release." *J Virol* **80**(19): 9465-80.
- Le Trong, I., R. E. Stenkamp, et al. (2002). "1.3-A resolution structure of human glutathione S-transferase with S-hexyl glutathione bound reveals possible extended ligand binding site." *Proteins* **48**(4): 618-27.
- Lee, N. S., T. Dohjima, et al. (2002). "Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells." *Nat Biotechnol* **20**(5): 500-5.
- Lee, T. C., B. A. Sullenger, et al. (1992). "Overexpression of RRE-derived sequences inhibits HIV-1 replication in CEM cells." *New Biol* **4**(1): 66-74.
- Legrand, C., J. M. Bour, et al. (1992). "Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected]." *J Biotechnol* **25**(3): 231-43.
- Levy, J. A., A. D. Hoffman, et al. (1984). "Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS." *Science* **225**(4664): 840-2.
- Lewin, B. (2000). *Genes VII*, Oxford University Press.
- Li, J., Y. Liu, et al. (2002a). "Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway." *J Virol* **76**(16): 8374-82.

- Li, J., Y. Liu, et al. (2002b). "Expression of exogenous Sam68, the 68-kilodalton SRC-associated protein in mitosis, is able to alleviate impaired Rev function in astrocytes." J Virol **76**(9): 4526-35.
- Lim, K., J. X. Ho, et al. (1994). "Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV." Protein Sci **3**(12): 2233-44.
- Liu, R., W. A. Paxton, et al. (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." Cell **86**(3): 367-77.
- Lu, J., P. Sista, et al. (2004). "Relative replicative fitness of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide (T-20)." J Virol **78**(9): 4628-37.
- Ludwig, E., F. C. Silberstein, et al. (1999). "Diminished rev-mediated stimulation of human immunodeficiency virus type 1 protein synthesis is a hallmark of human astrocytes." J Virol **73**(10): 8279-89.
- Malim, M. H. and B. R. Cullen (1991). "HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency." Cell **65**(2): 241-8.
- Malim, M. H., J. Hauber, et al. (1989). "The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA." Nature **338**(6212): 254-7.
- Mann, D. A., I. Mikaelian, et al. (1994). "A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression." J Mol Biol **241**(2): 193-207.
- Mannervik, B. and U. H. Danielson (1988). "Glutathione transferases--structure and catalytic activity." CRC Crit Rev Biochem **23**(3): 283-337.
- Martin-Serrano, J., A. Yarovoy, et al. (2003a). "Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12414-9.
- Martin-Serrano, J., T. Zang, et al. (2001). "HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress." Nat Med **7**(12): 1313-9.
- Martin-Serrano, J., T. Zang, et al. (2003b). "Role of ESCRT-I in retroviral budding." J Virol **77**(8): 4794-804.
- McCullough, J., P. E. Row, et al. (2006). "Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery." Curr Biol **16**(2): 160-5.
- McCutchan, F. E. (2006). "Global epidemiology of HIV." J Med Virol **78** Suppl 1: S7-S12.
- Menzo, S., A. Castagna, et al. (2004). "Resistance and replicative capacity of HIV-1 strains selected in vivo by long-term enfuvirtide treatment." New Microbiol **27**(2 Suppl 1): 51-61.
- Meyer, B. E., J. L. Meinkoth, et al. (1996). "Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev-Proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals." J Virol **70**(4): 2350-9.
- Meyer, P. R., S. E. Matsuura, et al. (2000). "Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates." Antimicrob Agents Chemother **44**(12): 3465-72.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratories

- Miller, M. D., C. M. Farnet, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition." J Virol **71**(7): 5382-90.
- Mindel, A. and M. Tenant-Flowers (2001). "ABC of AIDS: Natural history and management of early HIV infection." Bmj **322**(7297): 1290-3.
- Misquitta, S. A. and R. F. Colman (2005). "Communication between the two active sites of glutathione S-transferase A1-1, probed using wild-type-mutant heterodimers." Biochemistry **44**(24): 8608-19.
- Miyazaki, Y., T. Nosaka, et al. (1996). "The post-transcriptional regulator Rev of HIV: implications for its interaction with the nucleolar protein B23." Biochimie **78**(11-12): 1081-6.
- Modem, S., K. R. Badri, et al. (2005). "Sam68 is absolutely required for Rev function and HIV-1 production." Nucleic Acids Res **33**(3): 873-9.
- Moreira, R. F. and C. J. Noren (1995). "Minimum duplex requirements for restriction enzyme cleavage near the termini of linear DNA fragments." Biotechniques **19**(1): 56, 58-9.
- Morel, F., C. Rauch, et al. (2002). "The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter." Pharmacogenetics **12**(4): 277-86.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1992). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986." Biotechnology **24**: 17-27.
- Naeger, L. K., N. A. Margot, et al. (2001). "Increased drug susceptibility of HIV-1 reverse transcriptase mutants containing M184V and zidovudine-associated mutations: analysis of enzyme processivity, chain-terminator removal and viral replication." Antivir Ther **6**(2): 115-26.
- Nalin, C. M., R. D. Purcell, et al. (1990). "Purification and characterization of recombinant Rev-Protein of human immunodeficiency virus type 1." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7593-7.
- Neumann, M., E. Afonina, et al. (2001). "Nucleocytoplasmic transport in human astrocytes: decreased nuclear uptake of the HIV Rev shuttle protein." J Cell Sci **114**(Pt 9): 1717-29.
- Neville, M., F. Stutz, et al. (1997). "The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export." Curr Biol **7**(10): 767-75.
- Nie, Z., D. Bergeron, et al. (1998). "The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells." J Virol **72**(5): 4104-15.
- Nielsen, M. H., F. S. Pedersen, et al. (2005). "Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication." Retrovirology **2**: 10.
- Nilsson, L. O., A. Gustafsson, et al. (2000). "Redesign of substrate-selectivity determining modules of glutathione transferase A1-1 installs high catalytic efficiency with toxic alkenal products of lipid peroxidation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9408-12.
- Nilsson, L. O. and B. Mannervik (2001). "Improved heterologous expression of human glutathione transferase A4-4 by random silent mutagenesis of codons in the 5' region." Biochim Biophys Acta **1528**(2-3): 101-6.
- Nolan, D. (2003). "Metabolic complications associated with HIV protease inhibitor therapy." Drugs **63**(23): 2555-74.
- Nosaka, T., T. Takamatsu, et al. (1993). "Cytotoxic activity of Rev-Protein of human immunodeficiency virus type 1 by nucleolar dysfunction." Exp Cell Res **209**(1): 89-102.

- O'Sullivan, S. M., R. M. McCarthy, et al. (2006). "Chemical modification at subunit 1 of rat kidney Alpha class glutathione transferase with 2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzoquinone: close structural connectivity between glutathione conjugation activity and non-substrate ligand binding." *Biochem Pharmacol* **71**(11): 1629-36.
- Oakley, A. J., M. Lo Bello, et al. (1999). "The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site)." *J Mol Biol* **291**(4): 913-26.
- Oestreich, A. J., B. A. Davies, et al. (2007). "Mvb12 is a novel member of ESCRT-I involved in cargo selection by the multivesicular body pathway." *Mol Biol Cell* **18**(2): 646-57.
- Oldfield, V., G. M. Keating, et al. (2005). "Enfuvirtide: a review of its use in the management of HIV infection." *Drugs* **65**(8): 1139-60.
- Paillart, J. C., R. Marquet, et al. (1996). "Dimerization of retroviral genomic RNAs: structural and functional implications." *Biochimie* **78**(7): 639-53.
- Patnaik, A., V. Chau, et al. (2000). "Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13069-74.
- Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, et al. (2003). "Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages." *J Cell Biol* **162**(3): 443-55.
- Perelson, A. S., A. U. Neumann, et al. (1996). "HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time." *Science* **271**(5255): 1582-6.
- Pettigrew, N. E. and R. F. Colman (2001). "Heterodimers of glutathione S-transferase can form between isoenzyme classes pi and mu." *Arch Biochem Biophys* **396**(2): 225-30.
- Phizicky, E. M. and S. Fields (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." *Microbiol Rev* **59**(1): 94-123.
- Pineda-Molina, E., H. Belrhali, et al. (2006). "The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment." *Traffic* **7**(8): 1007-16.
- Plavec, I., M. Agarwal, et al. (1997). "High transdominant RevM10 protein levels are required to inhibit HIV-1 replication in cell lines and primary T cells: implication for gene therapy of AIDS." *Gene Ther* **4**(2): 128-39.
- Pomerantz, R. J., T. Seshamma, et al. (1992). "Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency." *J Virol* **66**(3): 1809-13.
- Pomerantz, R. J., D. Trono, et al. (1990). "Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency." *Cell* **61**(7): 1271-6.
- Popov, S., M. Rexach, et al. (1998). "Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex." *Embo J* **17**(4): 909-17.
- Pornillos, O., S. L. Alam, et al. (2002a). "Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein." *Nat Struct Biol* **9**(11): 812-7.
- Pornillos, O., J. E. Garrus, et al. (2002b). "Mechanisms of enveloped RNA virus budding." *Trends Cell Biol* **12**(12): 569-79.
- Pornillos, O., D. S. Higginson, et al. (2003). "HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein." *J Cell Biol* **162**(3): 425-34.
- Raiborg, C., T. E. Rusten, et al. (2003). "Protein sorting into multivesicular endosomes." *Curr Opin Cell Biol* **15**(4): 446-55.
- Raposo, G., M. Moore, et al. (2002). "Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments." *Traffic* **3**(10): 718-29.

- Raymond, C. K., I. Howald-Stevenson, et al. (1992). "Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants." Mol Biol Cell **3**(12): 1389-402.
- Razi, M. and C. E. Futter (2006). "Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation." Mol Biol Cell **17**(8): 3469-83.
- Reddy, T. R., W. Xu, et al. (1999). "Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev." Nat Med **5**(6): 635-42.
- Renda, M. J., J. D. Rosenblatt, et al. (2001). "Mutation of the methylated tRNA(Lys)(3) residue A58 disrupts reverse transcription and inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **75**(20): 9671-8.
- Rhodijs, V. A. and S. J. Busby (1998). "Positive activation of gene expression." Curr Opin Microbiol **1**(2): 152-9.
- Richie, J. P., Jr., L. Skowronski, et al. (1996). "Blood glutathione concentrations in a large-scale human study." Clin Chem **42**(1): 64-70.
- Robertson, D. L., J. P. Anderson, et al. (2000). "HIV-1 nomenclature proposal." Science **288**(5463): 55-6.
- Ruhl, M., M. Himmelspach, et al. (1993). "Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation." J Cell Biol **123**(6 Pt 1): 1309-20.
- Sachse, M., S. Urbe, et al. (2002). "Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes." Mol Biol Cell **13**(4): 1313-28.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, CSH Laboratory Press.
- Sayed, Y., J. A. Hornby, et al. (2002). "Thermodynamics of the ligandin function of human class Alpha glutathione transferase A1-1: energetics of organic anion ligand binding." Biochem J **363**(Pt 2): 341-6.
- Sayed, Y., L. A. Wallace, et al. (2000). "The hydrophobic lock-and-key intersubunit motif of glutathione transferase A1-1: implications for catalysis, ligandin function and stability." FEBS Lett **465**(2-3): 169-72.
- Scarlata, S. and C. Carter (2003). "Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly." Biochim Biophys Acta **1614**(1): 62-72.
- Schols, D., S. Struyf, et al. (1997). "Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4." J Exp Med **186**(8): 1383-8.
- Schooley, R. T., T. C. Merigan, et al. (1990). "Recombinant soluble CD4 therapy in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase I-II escalating dosage trial." Ann Intern Med **112**(4): 247-53.
- Sevrioukov, E. A., N. Moghrabi, et al. (2005). "A mutation in dVps28 reveals a link between a subunit of the endosomal sorting complex required for transport-I complex and the actin cytoskeleton in Drosophila." Mol Biol Cell **16**(5): 2301-12.
- Sharp, P. A. (2001). "RNA interference--2001." Genes Dev **15**(5): 485-90.
- Sharp, P. M. and M. Bulmer (1988). "Selective differences among translation termination codons." Gene **63**(1): 141-5.
- Shaywitz, A. J., S. L. Dove, et al. (2002). "Analysis of phosphorylation-dependent protein-protein interactions using a bacterial two-hybrid system." Sci STKE **2002**(142): PL11.
- Shevchuk, N. A., A. V. Bryksin, et al. (2004). "Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously." Nucleic Acids Res **32**(2): e19.
- Singwi, S. and S. Joshi (2000). "Potential nuclease-based strategies for HIV gene therapy." Front Biosci **5**: D556-79.

- Slagsvold, T., R. Aasland, et al. (2005). "Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain." J Biol Chem **280**(20): 19600-6.
- Slagsvold, T., K. Pattni, et al. (2006). "Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins." Trends Cell Biol **16**(6): 317-26.
- Stauber, R., G. A. Gaitanaris, et al. (1995). "Analysis of trafficking of Rev and transdominant Rev-Proteins in living cells using green fluorescent protein fusions: transdominant Rev blocks the export of Rev from the nucleus to the cytoplasm." Virology **213**(2): 439-49.
- Stauber, R. H., K. Horie, et al. (1998). "Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants." Biotechniques **24**(3): 462-6, 468-71.
- Strack, B., A. Calistri, et al. (2000). "A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13063-8.
- Strack, B., A. Calistri, et al. (2003). "AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding." Cell **114**(6): 689-99.
- Strebel, K. (2003). "Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev." Aids **17 Suppl 4**: S25-34.
- Sundquist, W. I. and S. Heaphy (1993). "Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3393-7.
- Surendran, R., P. Herman, et al. (2004). "HIV Rev self-assembly is linked to a molten-globule to compact structural transition." Biophys Chem **108**(1-3): 101-19.
- Tang, H., K. L. Kuhen, et al. (1999). "Lentivirus replication and regulation." Annu Rev Genet **33**: 133-70.
- Tatusova, T. A. and T. L. Madden (1999). "BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences." FEMS Microbiol Lett **174**(2): 247-50.
- Taylor, J. H., P. S. Woods, et al. (1957). "The Organization and Duplication of Chromosomes as Revealed by Autoradiographic Studies Using Tritium-Labeled Thymidine." Proc Natl Acad Sci U S A **43**(1): 122-8.
- Temesgen, Z., D. Warnke, et al. (2006). "Current status of antiretroviral therapy." Expert Opin Pharmacother **7**(12): 1541-54.
- Teo, H., D. J. Gill, et al. (2006). "ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes." Cell **125**(1): 99-111.
- Thomas, S. L., M. Oft, et al. (1998). "Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev-Protein oligomerization interface." J Virol **72**(4): 2935-44.
- Tiley, L. S., M. H. Malim, et al. (1992). "Identification of a high-affinity RNA-binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Rev-Protein." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 758-62.
- Truant, R. and B. R. Cullen (1999). "The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals." Mol Cell Biol **19**(2): 1210-7.
- Turner, B. G. and M. F. Summers (1999). "Structural biology of HIV." J Mol Biol **285**(1): 1-32.
- Urbanowski, J. L. and R. C. Piper (2001). "Ubiquitin sorts proteins into the intraluminal degradative compartment of the late-endosome/vacuole." Traffic **2**(9): 622-30.
- Van Heuverswyn, F., Y. Li, et al. (2006). "Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas." Nature **444**(7116): 164.
- Van Ryk, D. I. and S. Venkatesan (1999). "Real-time kinetics of HIV-1 Rev-Rev response element interactions. Definition of minimal binding sites on RNA and protein and stoichiometric analysis." J Biol Chem **274**(25): 17452-63.

- Velichkova, M. and T. Hasson (2005). "Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism." Mol Cell Biol **25**(11): 4501-13.
- Vitte, A. L., S. Buchsbaum, et al. (2006). "Modulation of HIV-1 Rev-Protein abundance and activity by polyubiquitination with unconventional Lys-33 branching." FEBS Lett **580**(26): 6155-60.
- Vodicka, M. A., D. M. Koepp, et al. (1998). "HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection." Genes Dev **12**(2): 175-85.
- von Schwedler, U. K., M. Stuchell, et al. (2003). "The protein network of HIV budding." Cell **114**(6): 701-13.
- Wadia, J. S. and S. F. Dowdy (2005). "Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer." Adv Drug Deliv Rev **57**(4): 579-96.
- Wallace, L. A., J. Burke, et al. (2000). "Domain-domain interface packing at conserved Trp-20 in class alpha glutathione transferase impacts on protein stability." Biochim Biophys Acta **1478**(2): 325-32.
- Walmsley, S., K. Henry, et al. (2003). "Enfuvirtide (T-20) cross-reactive glycoprotein 41 antibody does not impair the efficacy or safety of enfuvirtide." J Infect Dis **188**(12): 1827-33.
- Watts, N. R., M. Misra, et al. (1998). "Three-dimensional structure of HIV-1 Rev-Protein filaments." J Struct Biol **121**(1): 41-52.
- Weber, J. (2001). "The pathogenesis of HIV-1 infection." Br Med Bull **58**: 61-72.
- Wen, W., J. L. Meinkoth, et al. (1995). "Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus." Cell **82**(3): 463-73.
- Williamson, J. R., J. L. Battiste, et al. (1995). "Interaction of HIV Rev peptides with the Rev response element RNA." Nucleic Acids Symp Ser(33): 46-8.
- Wingfield, P. T., S. J. Stahl, et al. (1991). "HIV-1 Rev expressed in recombinant Escherichia coli: purification, polymerization, and conformational properties." Biochemistry **30**(30): 7527-34.
- Woffendin, C., U. Ranga, et al. (1996). "Expression of a protective gene-prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2889-94.
- Wolff, B., J. J. Sanglier, et al. (1997). "Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev-Protein and Rev-dependent mRNA." Chem Biol **4**(2): 139-47.
- Wu, Y. (2004). "HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA." Retrovirology **1**: 13.
- Yang, J., H. P. Bogerd, et al. (1999). "An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev-Protein." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13404-8.
- York, J. L., L. C. Maddox, et al. (1998). "Reduction of MTT by glutathione S-transferase." Biotechniques **25**(4): 622-4, 626-8.
- Zack, J. A., S. J. Arrigo, et al. (1990). "HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure." Cell **61**(2): 213-22.
- Zapp, M. L., T. J. Hope, et al. (1991). "Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev-Protein: a dual function for an arginine-rich binding motif." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(17): 7734-8.
- Zemmel, R. W., A. C. Kelley, et al. (1996). "Flexible regions of RNA structure facilitate cooperative Rev assembly on the Rev-response element." J Mol Biol **258**(5): 763-77.

- Zhan, Y. and G. S. Rule (2004). "Glutathione induces helical formation in the carboxy terminus of human glutathione transferase A1-1." Biochemistry **43**(23): 7244-54.
- Zhu, P., J. Liu, et al. (2006). "Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes." Nature **441**(7095): 847-52.
- Zou, Y. R., A. H. Kottmann, et al. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-9.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Ruth Brack-Werner danke ich sehr dafür, daß sie meine Themenwahl unterstützte und die Durchführung der Arbeit engagiert betreute.

Prof. Dr. Thomas Cremer gebührt mein Dank für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Retrovirale Regulation“, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, meinen Dank aussprechen. Hierbei denke ich insbesondere an die tatkräftige Hilfe, die mir Antje Haniss zuteil werden ließ.

Mein Dank geht auch an Frau Witte und Frau Voll für ihre aufmunternden Worte.

Und schließlich bedanke ich mich bei dem Team der Spülküche für die Unterstützung bei „Extrawünschen“ und für die tägliche zuverlässige Arbeit.

Lebenslauf

Till Treptow

Diplom-Biologe (Univ.)

geb. 17.11.1973 in München

Griegstraße 53

80807 München

Telefon: 089 / 35099966

E-Mail: Till.Treptow@web.de

- 1984 - 1993 Lion-Feuchtwanger-Gymnasium, München
Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
- IX 1993 - XI 1994 Wehrersatzdienst: mobiler sozialer Hilfsdienst beim Bayerischen Roten Kreuz
- 1994 - 2001 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München; Abschluß mit der Gesamtnote „Sehr Gut“

Leistungsbezogenes Stipendium der Hans-Rudolf-Stiftung, München

Aufgrund herausragender Vordiplomsleistungen als Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes vorgeschlagen
- 2003 - 2007 Promotionsarbeit am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg, Institut für Molekulare Virologie
- III 2006 Posterpräsentation auf der Tagung der Gesellschaft für Virologie, München
- XII 2006 Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit (BBS) am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Till Treptow

München, Dezember 2007

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, daß die Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist und noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen hat.

Till Treptow

Dez., 2007

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, daß dies mein erster Promotionsversuch ist.

Till Treptow

Dez., 2007