

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

Thema:

**Interaktionen des HIV-1 Rev Regulationsfaktors mit
zellulären RNA-Bindungsproteinen**

Vorgelegt von:
Kamyar Hadian

München, Mai 2008

Angefertigt am:
HelmholtzZentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Institut für Virologie

Gutachter:

Erstgutachterin: Prof. Dr. Ruth Brack-Werner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2009

*Meiner Familie
und Michelle*

1. Einleitung	005
1.1. Einführung	005
1.2. Das HIV-1 Genom und seine Proteine	005
1.3. Der HIV-1 Replikationszyklus	007
1.4. Das regulatorische Protein Rev	010
1.5. HIV-1 Rev in humanen Astrozyten	014
1.6. Zelluläre Interaktionspartner von HIV-1 Rev	016
1.7. Wichtige Eigenschaften von hnRNP-Proteinen	019
1.8. Zielsetzung der Arbeit	020
2. Material und Methoden	021
2.1. Material	021
2.1.1. Puffer	021
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien	022
2.1.3. Kits	023
2.1.4. Medien	024
2.1.5. Verbrauchsmaterialien	025
2.1.6. Geräte	025
2.1.7. Antikörper	027
2.1.8. Oligonucleotid-Primer	027
2.1.9. Software	028
2.1.10. Plasmide	029
2.1.10.1. Eukaryotische Expressionsvektoren	029
2.1.10.2. Prokaryotische Expressionsvektoren	031
2.1.11. Bakterien	032
2.1.12. Humane Zelllinien	033
2.2. Methoden	034
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	034
2.2.1.1. Restriktionsverdau	034
2.2.1.2. Gelelektrophorese	034
2.2.1.3. DNA-Isolierung mittels Gelextraktion	034
2.2.1.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	035
2.2.1.5. TOPO-TA Klonierung	036
2.2.1.6. Ligation	036
2.2.1.7. Transformation	037
2.2.1.8. Plasmidisolierung	037
2.2.1.8.1. Minipräparation	037
2.2.1.8.2. Maxipräparation	038
2.2.1.9. Herstellung von Glycerol-Stammkulturen	038
2.2.1.10. Sequenzierung	038
2.2.1.11. RNA-Isolierung und DNase-Verdau von genomischer DNA	038
2.2.1.12. Herstellung von cDNAs	039

2.2.2.	Zellkultur, Mikroskopieren, exBIFC- und Funktions-Analyse.....	039
2.2.2.1.	Arbeiten mit humanen Zelllinien	039
2.2.2.2.	Fugene Transfektion.....	040
2.2.2.3.	Herstellung stabiler Zelllinien	040
2.2.2.4.	Auftauen und Einfrieren von humanen Zelllinien.....	041
2.2.2.5.	Mikroskopieren am Cell Observer.....	041
2.2.2.6.	exBIFC-Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen.....	042
2.2.2.7.	Funktionsanalysen.....	044
2.2.2.7.1.	Rev-Reporter-System.....	044
2.2.2.7.2.	Nachweis von intra- und extrazellulärem p24 mittels ELISA.....	046
2.2.3.	Proteinchemische Methoden.....	047
2.2.3.1.	Zellaufschluss von eukaryotischen Zellen.....	047
2.2.3.2.	Co-Immunpräzipitation.....	048
2.2.3.3.	Rekombinante Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	049
2.2.3.4.	Zellaufschluss von prokaryotischen Zellen	050
2.2.3.5.	<i>Strep</i> TagII-Affinitätschromatographie mit rekombinanten Proteinen und humanen Zelllysaten.....	050
2.2.3.6.	SDS-PAGE	051
2.2.3.7.	Colloidal Coomassie Färbung.....	051
2.2.3.8.	Western Blot-Analyse.....	052
2.2.3.9.	Bestimmung der optischen Dichte einer Protein- lösung mittels der Bradford Methode	052
2.2.3.10.	MALDI-TOF Massenspektrometrie	053
2.2.3.11.	RNA Interferenz mittels synthetischer siRNAs.....	053
3.	Ergebnisse.....	054
3.1.	Der <i>Strep</i> TagII hat keinen Einfluss auf die Lokalisation und Funktion von RevGFP in humanen Zellen.....	054
3.2.	Generierung von zwei stabil RevGFP- <i>Strep</i> TagII bzw. GFP- <i>Strep</i> TagII exprimierenden Astrozytenzelllinien (U138MG).....	056
3.3.	Interaktionsstudien mit bakteriell hergestelltem Rev-Protein.....	058
3.3.1.	Isolierung von zellulären Rev-interagierenden Proteinen aus Astrozytenzelllysaten mit Hilfe von bakteriell hergestelltes RevGFP- <i>Strep</i> TagII	058
3.3.2.	Verifikation der Interaktion von Rev mit mehreren Rev-interagierenden Proteinen durch Co-Immunpräzipitation.....	064
3.3.3.	Untersuchung der Interaktion von Rev mit hnRNP-A1 und hnRNP-Q mittels exBIFC Methode in HeLa-Zellen.....	066
3.3.4.	Untersuchung der zelltypabhängigen Interaktion von Rev mit hnRNP-A1 und hnRNP-Q.....	068

3.3.5.	Die ersten 14 Aminosäuren des Rev-Proteins interagieren mit hnRNP-A1 und hnRNP-Q.....	070
3.4.	Untersuchung der Produktion des Reporterproteins im Rev-abhängigen Reportersystem unter dem Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q.....	072
3.4.1.	Untersuchung der Aktivität N-terminaler RevGFP-Deletionsmutanten.....	072
3.4.2.	Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die Produktion des Reporterproteins im Reportersystem nach Co-Expression mit RevGFP.....	075
3.4.3.	Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die Produktion des Reporterproteins im Reportersystem nach Co-Expression mit N-terminalen Rev-Deletionsmutanten.....	082
3.5.	Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die HIV-1 Replikation.....	085
3.6.	Untersuchung der Interaktion weiterer hnRNP-Proteine mit HIV-1 Rev In Astrozyten.....	092
4.	Diskussion.....	096
4.1.	<i>Strep</i> TagII-Affinitätschromatographie eignet sich für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen <i>in vitro</i>	096
4.2.	Untersuchung von Rev-interagierenden Faktoren mit bakteriell hergestelltem RevGFP- <i>Strep</i> TagII und humanen Astrozytenzelllysaten....	097
4.2.1.	Das bakteriell hergestellte Rev-Protein interagiert mit PABP1 bzw. Nucleolin, PARP1, Histon H2A und NAP1L1, die mit dem Chromatin in Zusammenhang stehen.....	098
4.2.2.	Die RNA-Bindungsproteine hnRNP-A1, E1, E2, K, Q, R und U interagieren mit HIV-1 Rev.....	101
4.3.	Der N-Terminus des Rev-Proteins bindet mehrere hnRNP-Proteine und hat einen zelltypabhängigen Einfluss auf die Rev-Funktion.....	111
4.3.1.	Interaktionssequenz für mehrere hnRNP-Proteine im N-Terminus von HIV-1 Rev.....	111
4.3.2.	Die Deletion der Aminosäuren 2 – 14 des Rev-Proteins führt zu einem Funktionsverlust von Rev in HeLa-Zellen, jedoch nicht in Astrozyten.....	112
4.4.	Zelltypabhängige Interaktion von Rev mit hnRNP-A1.....	113
4.5.	Die Proteine hnRNP-A1 und Q sind Stimulatoren der Rev-abhängigen Reporterprotein-Produktion.....	118
4.6.	Die Proteine hnRNP-A1 und Q steigern die p24 Produktion in chronisch HIV-1 infizierten Zelllinien.....	119
4.7.	Bedeutung der Interaktion von Rev mit hnRNP-Proteinen.....	120

5. Zusammenfassung	123
6. Ausblick	124
7. Verwendete Abkürzungen	125
8. Literaturverzeichnis	127
9. Danksagung	138
10. Anhang	139
10.1. In dieser Arbeit hergestellte Expresssionskonstrukte.....	139
10.1.1. Eukaryotische Expressionsplasmide.....	139
10.1.2. Prokaryotische Expressionsplasmide.....	139
10.2. Publizierte, Rev-interagierende Faktoren.....	140
Lebenslauf	144
Publikationen	145
Erklärung	146

1. Einleitung

1.1. Einführung

Ende der 70er Jahre und Anfang der 80er Jahre wurden mehrere Fälle von Erkrankungen, infolge starker immunologischer Schwächung, von der „Centers for Disease Control and Prevention“ (CDC) gemeldet. Diese waren begleitet von Lymphadenopathien, ungewöhnlichen Tumorerkrankungen (non-Hodgkin Lymphomen und Kaposi Sarkomen) bzw. opportunistischen Erkrankungen wie einer Lungenentzündung. Hauptsächlich waren homosexuelle Männer und Drogenkonsumenten von dem „erworbenen Immunschwäche-Syndrom“ (engl. AIDS) betroffen. Ein neuer Typ von Virus wurde aus erkrankten Patienten von Wissenschaftlern des Pariser Pasteur Instituts um Montagnier (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983), von Gallo und Kollegen am NIH (Gallo *et al.*, 1984; Gallo *et al.*, 1983; Popovic *et al.*, 1984 b) (Gallo and Montagnier, 2003) und von Levy und Mitarbeitern am UCSF (Levy *et al.*, 1984) isoliert. Dieses Virus wurde später als Humanes Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) bezeichnet.

Das HIV-Genom zeigt eine nahe Verwandtschaft zu replikationsfähigen Retroviren des Genus der Lentiviren (Chiu *et al.*, 1985). Phylogenetische Untersuchungen von geographisch unterschiedlichen Isolaten aus Europa, Nordamerika und Afrika ergaben drei HIV-1 Gruppen, welche als M (main)-, O (outlier)- und N (non-M /non-O)-Gruppe definiert wurden (Gao *et al.*, 1999). Die Gruppe M enthält etwa 95 % aller isolierten Viren und lässt sich in mehrere genetische Subtypen (u.a. A, B, C, D, F, G, H, J und K) unterteilen (Robertson *et al.*, 2000).

Nach Berichten der UNAIDS und WHO waren Ende 2007 etwa 33 Millionen Menschen HIV infiziert. Etwa zwei Millionen Menschen starben an den Folgen der Infektion im Jahr 2007.

1.2. Das HIV Genom und seine Proteine

Das HIV-1 Genom ist etwa 9 kb groß und besitzt insgesamt neun offene Leserahmen. Drei dieser Leserahmen kodieren für die drei Polyproteine Gag, Pol und Env. Somit besitzt HIV den für Retroviren typischen Genomaufbau. An den Enden der reverse transkribierten HIV-DNA befinden sich die 5'- und 3'- Long terminal repeats (LTRs). Die 5'-LTR dient als Promotor, wohingegen die 3'-LTR das Transkriptionsterminations- und das Poly-A-Signal enthält (Freed, 2001).

Das Gen *gag* kodiert für die Proteine Matrix **MA (p17)**, Kapsid **CA (p24)**, Nukleokapsid **NC (p7)** und p6. *Pol* kodiert für die Enzyme Reverse Transkriptase **RT (p66/p51)**, Protease **PR (p11)** und Integrase **IN (p31)**. Das Transmembranprotein **gp41 (TM)** und das Oberflächenprotein **gp120 (SU)** sind im Gen *env* kodiert. Zusätzlich werden sechs weitere Proteine gebildet. Diese sind Rev, Tat, Nef, Vif, Vpr und Vpu (Cullen, 1998a; Frankel and Young, 1998). Das provirale Genom des HIV-1 ist schematisch in Abbildung 1.1 dargestellt.

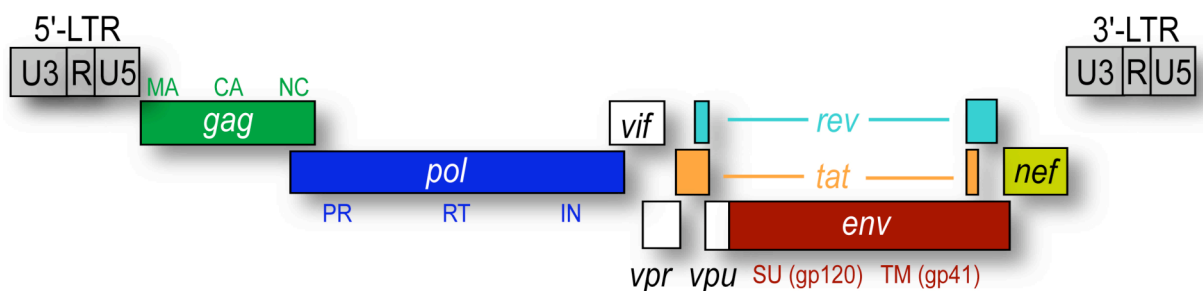


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung des HIV-1-Genoms

Die HIV-1 Gene sind auf verschiedene Leserahmen auf der viralen mRNA kodiert. Die virale RNA enthält die drei typischen retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env* und die Gene für *rev*, *tat*, *nef*, *vpr*, *vpu* und *vif*. An den beiden Enden der reverse transkribierten DNA befinden sich die 5'- und 3'-LTRs.

Die HIV-1 Proteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe an Proteinen (Nef, Rev und Tat) wird in der Zelle unabhängig von dem Rev-Protein gebildet. Die zweite Gruppe (Env, Gag, Pol, Vif, Vpr und Vpu) entstehen durch Translation von ungespleißten bzw. einfach gespleißten mRNA-Transkripten. Dieser Prozess ist Rev-abhängig.

In Abbildung 1.2 ist der Aufbau des HIV-1 Virions schematisch dargestellt.

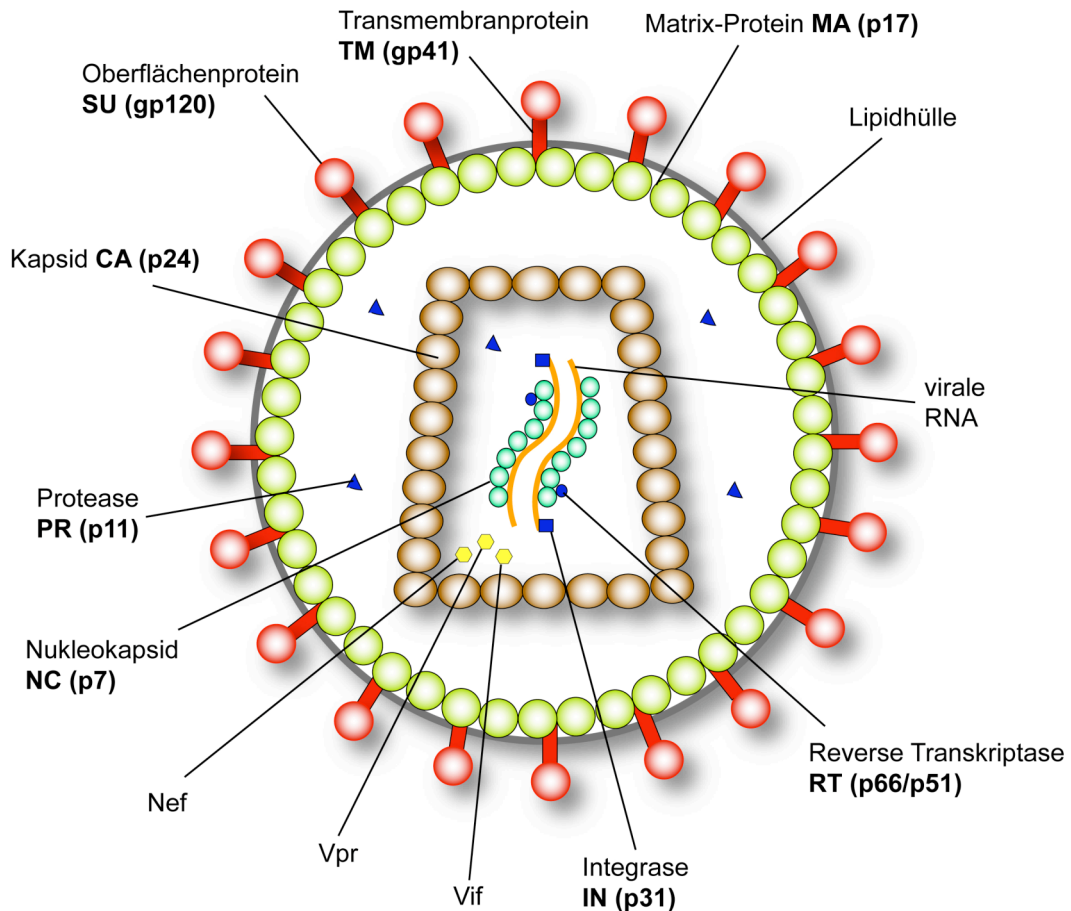


Abbildung 1.2.: Schematischer Aufbau des HIV-1 Virions

Die schematische Darstellung des Virus ist nicht maßstabsgetreu. In Klammern sind alternative Benennungen der Proteine erwähnt.

1.3. Der HIV-1 Replikationszyklus

Das HI-Virus gelangt über eine Infektion in die Wirtszelle und integriert als Provirus in das Wirtsgenom. Es kann auch über Endozytose von der Zelle aufgenommen werden, wobei es nicht vollständig geklärt ist, ob das Virus nach einer endozytotischen Aufnahme vollständig repliziert.

Nach Interaktion der Oberflächenproteine gp120 des Virus mit dem Oberflächenantigen CD4 der Wirtszelle, kommt es zu einer Konformationsänderung des gp120-Komplexes, wodurch die Bindungsstellen für Chemokinrezeptoren (Korezeptoren CCR5 und CXCR4) freigelegt werden. CCR5 ist der Korezeptor für R5 Isolate, wohingegen CXCR4 der Korezeptor der X4 Isolate ist. Es gibt auch Dual-

trope HIV Isolate, die beide Rezeptoren verwenden können. Diese werden R5X4 genannt. Nach Interaktion von gp120 mit den Korezeptoren kommt es zu einer erneuten Konformationsänderung innerhalb des gp120/gp41-Komplexes. Dies führt zum Eindringen des gp41 Fusionspeptids in die Plasmamembran der Wirtszelle. Die Fusion (Abbildung 1.3 (1)) der Virusmembran mit der Plasmamembran führt zur Freisetzung des Kapsids in das Wirtszellinnere (Abbildung 1.3 (2)) (Freed, 2001; Greene and Peterlin, 2002; Sierra *et al.*, 2005). Die Freisetzung wird durch Phosphorylierung der Matrixproteine (Cartier *et al.*, 1999) und die viralen Proteine Nef (Schaeffer *et al.*, 2001) und Vif (Ohagen and Gabuzda, 2000) positiv beeinflusst. Das in die Zelle freigesetzte Kapsid wird geöffnet und es entsteht der Reverse-Transkriptase-Komplex (Abbildung 1.3 (3)). Die Reverse Transkriptase benützt tRNA^{Lys3}-Moleküle als Primer für das Umschreiben der viralen RNA in DNA. Durch ihre zusätzliche RNaseH-Aktivität, ist die RT in der Lage die RNA des neu-synthetisierten DNA/RNA-Hybrids abzubauen. Kleine RNA-Fragmente, die von der RNaseH nicht abgebaut wurden, werden als Primer für die Synthese des komplementären DNA-Stranges verwendet. Die Proteine Integrase, das Matrix-Protein MA und das Protein Vpr binden an diesen Komplex und bilden schließlich den Präintegrationskomplex (De Rijck *et al.*, 2007; Freed and Martin, 2001).

Der Präintegrationskomplex wird anschließend aktiv in den Zellkern transportiert (Abbildung 1.3 (4)). Das MA-Protein enthält ein nukleäres Lokalisationssignal. Die Proteine Integrase und Vpr enthalten ebenfalls Signale, die den Kernimport regulieren. Es wird vermutet, dass diese Proteine den Import beeinflussen. Mit Hilfe des Enzyms Integrase kommt es zur Integration der viralen DNA in die genomische DNA, wodurch das Virus als Provirus in der Zelle vorliegt (Abbildung 1.3 (5)) (Greene and Peterlin, 2002).

Mittels zellulärer Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B), die an die 5'-LTR binden, wird die Transkription des Provirus in Gang gesetzt. Vollständig gespleißte mRNA-Moleküle werden, nach Transport ins Zytoplasma, in die Proteine Tat, Rev und Nef translatiert, welche die Proteine der frühen Phase darstellen (Abbildung 1.3 (7-8)). Das Tat-Protein wird in den Zellkern transportiert und bindet an die TAR-Sequenz auf der mRNA (Abb 1.3 (6)) und rekrutiert die zellulären Moleküle Cyclin T und CDK9 an diese Stelle. CDK9 phosphoryliert die RNA-Polymerase II, wodurch es zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate kommt (Brady and Kashanchi, 2005; Peruzzi,

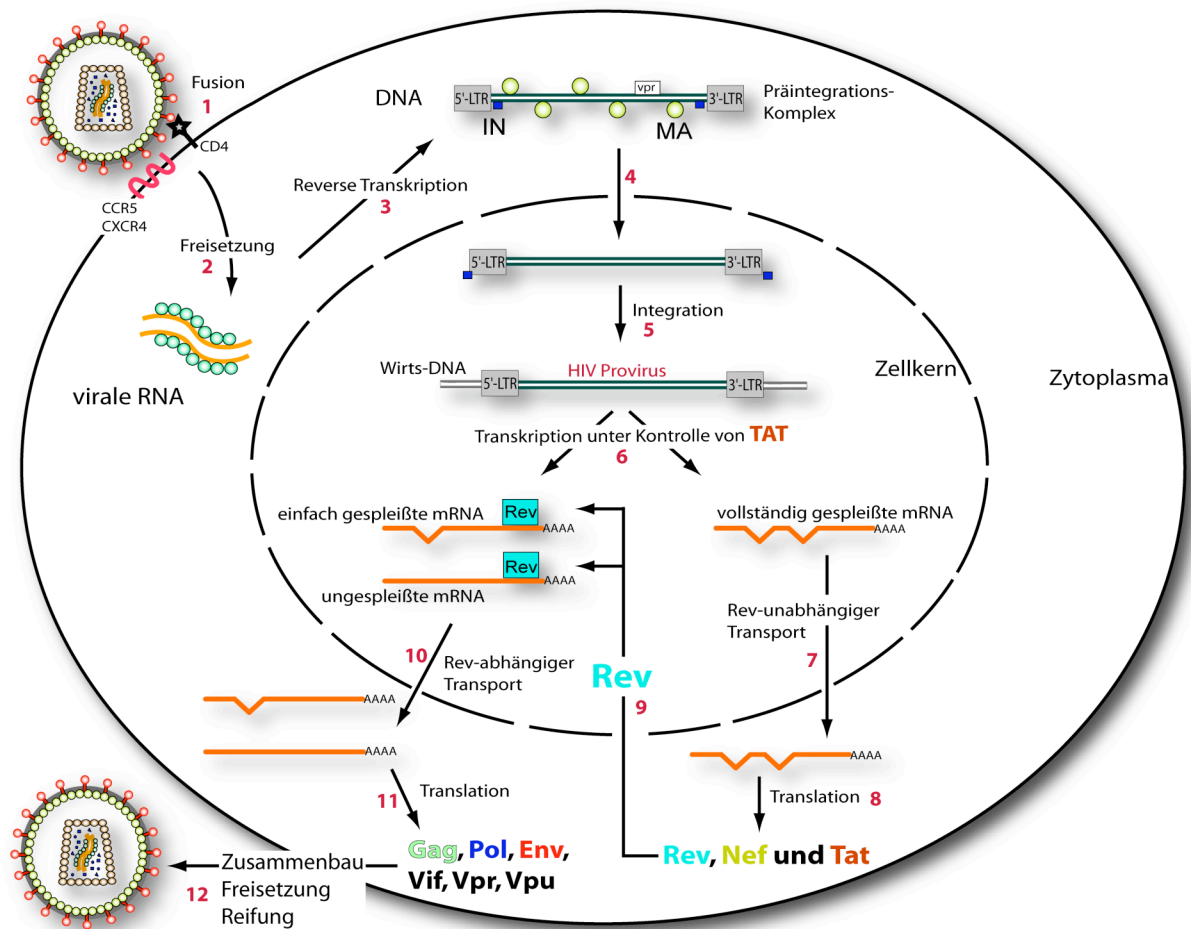
2006). Zudem besitzt das Tat-Protein eine wichtige Funktion bei der Rekrutierung von Histon Acetyltransferasen (HAT) zur Lockerung von Chromatinstrukturen an der 5'-LTR (Quivy *et al.*, 2007). Das Rev-Protein wird ebenfalls in den Zellkern transportiert und bindet dort an das Rev response element (RRE) auf unvollständig gespleißten mRNA-Molekülen (Abbildung 1.3 (9)). Das Rev-Protein, zusammen mit zahlreichen zellulären Proteinen, vermittelt den Transport von ungespleißten und einfach gespleißten mRNA-Molekülen in das Zytoplasma (Abbildung 1.3 (10)). Dies ermöglicht in der späten Phase die Bildung der Strukturproteine Matrix, Kapsid und Nucleocapsid, der Hüllproteine gp120 und gp41, der Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase und der Proteine Vif, Vpr und Vpu (Abbildung 1.3 (11)) (Freed, 2001). Gleichzeitig werden nur noch geringe Mengen an vollständig gespleißten mRNA-Molekülen gebildet. Daher entstehen in dieser Phase kaum regulatorische Proteine (Cullen, 1998b).

Die Gag- und Gag-Pol-Proteine werden an freien Ribosomen gebildet und lagern sich über den Myristylanker an die Innenseite der Plasmamembran an. Die Oberflächenmoleküle gp41 und gp120 entstehen am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) als gp160-Vorläuferprotein. Sie werden im ER und Golgiapparat in die einzelnen Proteine geschnitten und glykosyliert. Über den Golgi Apparat werden sie an die Zelloberfläche transportiert. Mit Hilfe der Matrixproteine werden zwei RNA-Moleküle, zusammen mit weiteren viralen Proteinen, in neue Virionen verpackt (Freed, 2001; Greene and Peterlin, 2002). Bei Knospung des Virus aus der Wirtszelle setzt sich die Protease autokatalytisch aus dem Gag-Pol Polyprotein frei. Als Dimer schneidet sie das Gag-Pol Vorläuferprotein in die einzelnen Gag und Pol Molekülbestandteile. Dadurch kommt es zur Reifung neuer Virionen (Abbildung 1.3 (12)).

Abbildung 1.3. (nächste Seite): Detaillierte Vorgänge im Replikationszyklus von HIV-1

Nach Fusion (1) und Freisetzung (2) wird die virale mRNA mittels Reverser Transkriptase in DNA umgeschrieben (3). Anschließend bildet sich der Präintegrationskomplex, der die Kernmembran aktiv passiert (4). Mit Hilfe der Integrase wird die DNA in das Wirtsgenom eingebaut (5).

Durch zelluläre Transkriptionsfaktoren wird die Transkription der Proteine Tat, Rev und Nef in der frühen Phase induziert (6-8). Nach Import von Tat und Rev in den Zellkern, bindet Tat an die TAR-Sequenz auf der mRNA und steigert die Transkriptionsrate. Rev vermittelt den Transport ungespleißter und unvollständig gespleißter mRNA ins Zytoplasma (9-10), sodass Strukturproteine, Enzyme, Vif, Vpr und Vpu entstehen können (11). Nach Zusammenbau, Freisetzung und Reifung entstehen neue Viren (12).



1.4. Das regulatorische Protein Rev

Rev ist ein kleines Phosphoprotein (116 Aminosäuren) mit einem berechneten Molekulargewicht von etwa 13 kDa. Eine sehr wichtige Aufgabe des Rev-Proteins ist die Stabilisierung und Vermittlung des Transports Intron-haltiger mRNA-Moleküle ins Zytoplasma. Eine Translation unvollständig gespleißter mRNA ist normalerweise in eukaryotischen Zellen nicht möglich. Diese RNA-Moleküle sind jedoch wichtig für die Produktion viraler Strukturproteine und Enzyme (Kjems and Askjaer, 2000). Dem Rev-Protein wird zudem eine wichtige Rolle bei der Translation der transportierten RNA zugeschrieben. Hierbei scheint das Rev-Protein die Assoziation der RNA an das Polysom zu fördern (Arrigo and Chen, 1992 a; D'Agostino *et al.*, 1992).

Das Rev-Protein „shuttelt“ zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma. Hierfür benötigt es zwei wichtige Moleküldomänen:

Das Kernexportsignal (NES) befindet sich im Bereich der Aminosäuren 75 bis 84 und besitzt mehrere, für die Funktion wichtige Leucin-Aminosäuren (Abbildung 1.4). Durch Bindung des zellulären Exportfaktors CRM1 und weiteren zellulären Proteinen und Nukleoporinen an diese Region, wird der Transport unvollständig gespleißter mRNA-Moleküle ins Zytoplasma vermittelt (Kjems and Askjaer, 2000; Malim *et al.*, 1991; Ragheb *et al.*, 1995). Das argininreiche Motiv (ARM) ist zum einen das Kernlokalisierungssignal (NLS) von Rev und vermittelt den Import von Rev in den Zellkern. Zum anderen stellt es die Bindesequenz für die mRNA dar. Die ARM-Region erstreckt sich von Aminosäure 35 bis 50 (Abbildung 1.4). Rev interagiert mit der RNA durch Bindung an die RRE-Sequenz, die in der *env*-Region kodiert ist. Die RRE ist eine Sekundärstruktur der RNA mit vielen Schleifen-Regionen. Die Stem-Loop-IIIB-Region (SLIIB) der RRE stellt die initiale Bindesequenz für das Rev-Protein dar (Hope *et al.*, 1990; Malim *et al.*, 1989).

Die volle Funktion von Rev wird durch Oligomerisierung des Proteins an der RNA erreicht. Die Bereiche, die zur Multimerbildung notwendig sind, sind nicht genau bekannt, werden jedoch auf die Aminosäuren 11 bis 29 und 52 bis 60 eingeschränkt (Thomas *et al.*, 1998) (Abbildung 1.4). Untersuchungen am C-Terminus von Rev zeigten, dass dieser Bereich auch für die Oligomerisierung wichtig ist. Eine Deletion der Aminosäuren 87 bis 116 setzte die Multimerisierungsfähigkeit um mehr als 80% herab, eine Deletion der Aminosäuren 101 bis 116 um 40% (Hakata *et al.*, 2002).

Die Tertiärstruktur des Rev-Proteins ist nicht vollständig geklärt. Für die aminoterminalen Hälfte des Rev-Proteins werden zwei α -Helices vorgeschlagen. Diese Daten wurden durch CD-Spektroskopie Untersuchungen (Auer *et al.*, 1994), NMR Studien (Blanco *et al.*, 2001; Havlin *et al.*, 2007) und Mutagenesestudien (Thomas *et al.*, 1997) ermittelt. Diese beiden Sekundärstrukturen sind durch eine prolinreiche Schleife voneinander getrennt. Die Schleife bringt die beiden α -Helices in räumliche Nähe, sodass sie miteinander interagieren und eine Helix-Loop-Helix-Struktur ausbilden können (Auer *et al.*, 1994). Die genauen Aminosäuren, welche die α -Helices ausbilden, sind noch nicht bekannt. Die Aminosäuren 8 bis 26 und 34 bis 59 können nach Studien von Thomas *et al.* für die Ausbildung der α -Helices ausschlaggebend sein (Thomas *et al.*, 1997) (Abbildung 1.4).

Die Aktivierungsfunktion von N-terminalen Rev-Deletionsmutanten wurde in einigen Studien untersucht. Hierbei konnten unterschiedliche Auswirkungen der N-terminalen Deletion auf die Rev Funktion ermittelt werden. Anhand der gemessenen Gag-Produktion konnten sowohl nahezu voll-funktionelle sowie funktionslose Rev-Mutanten beobachtet werden (Jeong et al., 2000; Malim et al., 1989). Dem C-terminalen Ende des Proteins konnte hingegen bis jetzt keine eindeutige Funktion zugewiesen werden. C-terminale Deletionsmutanten zeigten in Funktionstests gleiche Transaktivierungsfähigkeiten wie das Wildtyp-Protein (Lam et al., 1998; Venkatesh and Chinnadurai, 1990).

Die zelluläre Casein Kinase 2 phosphoryliert Rev an den Aminosäuren 5 und 8 (Marin et al., 2000; Meggio et al., 1996). Die Serine 54 und 56 werden hingegen durch die Proteinase K alpha-Untereinheit phosphoryliert (Fouts et al., 1997). Diese Phosphorylierung hat eine Änderung der Konformation zur Folge, wodurch die RNA-Bindungsaffinität gesteigert wird.

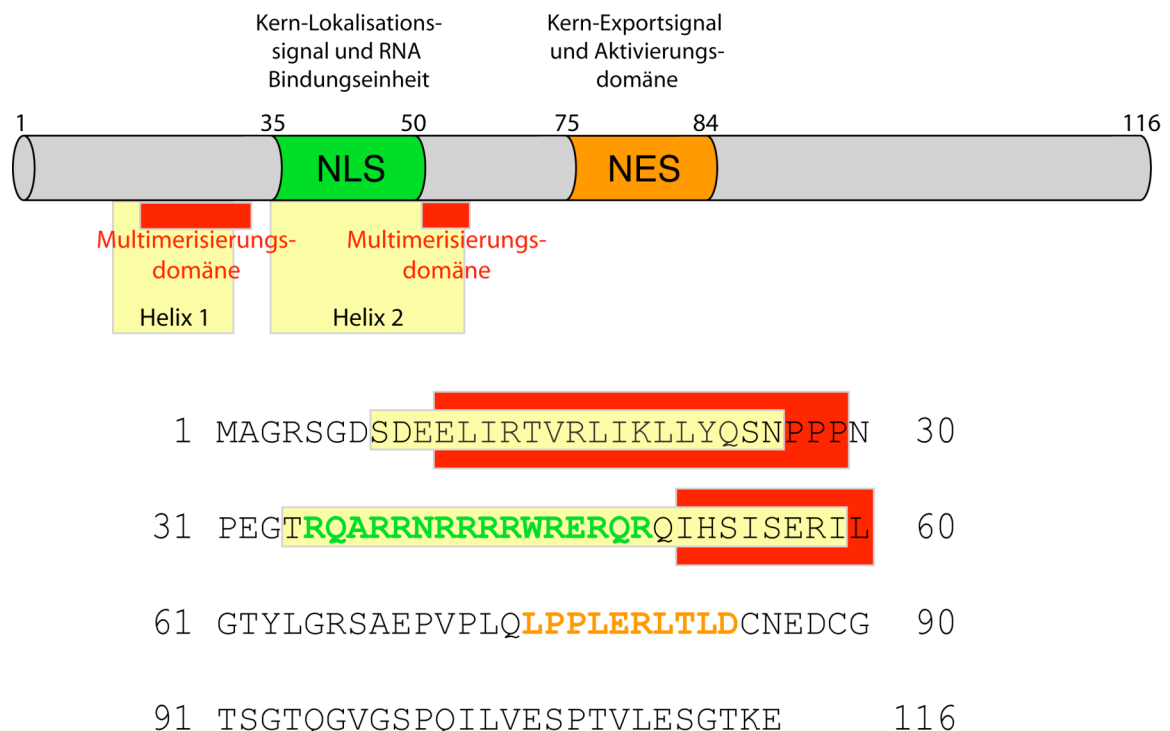


Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung der HIV-1 Rev-Sequenz.

Die Rev-Sequenz enthält mehrere wichtige Sequenzelemente. Die argininreiche Sequenz (ARM) von Aminosäure 35 bis 50 (grün) ist für die RNA-Bindung und den Import von Rev in den Zellkern wichtig (Nukleäres Lokalisationssignal - NLS). Die NES (orange) enthält mehrere Leucine und ist für den Export und somit die Transaktivierung durch Rev notwendig. Zusätzlich besitzt Rev zwei Multimerisierungsdomänen (rot), welche auf die Aminosäuren 11 bis 29 und 52 bis 60 eingeschränkt werden können. Die Bereiche, welche die beiden α -Helices ausbilden (gelb), reichen von Aminosäure 8 bis 29 bzw. von 34 bis 59.

Die Vermittlung des RNA-Transportes durch das Rev-Protein ist im Folgenden vereinfacht dargestellt.

Das Rev-Protein interagiert mit zwei wichtigen Transportfaktoren. CRM1 ist für den Export zuständig, Importin- β dagegen für den Import des Rev-Proteins. Beide zellulären Transportfaktoren werden über die RanGTPase reguliert. RanGTP ist in großen Mengen im Zellkern lokalisiert, wohingegen RanGDP nur in kleinen Mengen im Zellkern vorkommt. Das umgekehrte Verhältnis liegt im Zytoplasma vor (Mattaj and Englmeier, 1998).

Im ersten Schritt des mRNA-Exports kommt es zur Bindung von Rev an die mRNA mittels ARM-RRE-Interaktion. RanGTP-gebundenes CRM1 bindet anschließend an die NES des Rev-Proteins (Abbildung 1.5 (1)). Im zweiten Schritt gelangt dieser mRNA-Protein-Komplex zum Kernporenkomplex, wo sie mit mehreren Nukleoporinen (z.B. RIP/Rab, NLP-1 bzw. Nup-Proteinen) interagiert. Die Translokation durch die Kernpore ist nicht genau geklärt. Jedoch spielt die Interaktion von CRM1 mit den Nukleoporinen dabei eine wichtige Rolle. Im Zytoplasma wird das RanGTP des mRNA-Protein-Komplexes zu RanGDP hydrolysiert (Abbildung 1.5 (2)). Bei der Hydrolyse spielen die Proteine RanBP 1 und 2 eine wichtige Rolle. Durch die Hydrolyse wird CRM1 von dem mRNA-Protein-Komplex freigesetzt (Abbildung 1.5 (3)) (Freed, 2001). Die ungespleißte bzw. unvollständig gespleißte mRNA wird anschließend translatiert oder dient als Genom für die Freisetzung neuer Virionen. Rev bindet im nächsten Schritt mit seiner NLS an Importin- β und wird zurück in den Zellkern transportiert (Abbildung 1.5 (4)). Im Zellkern bindet RanGTP an Importin- β und verursacht die Freisetzung von Rev aus dem Komplex (Abbildung 1.5 (5)). Rev kann im nächsten Zyklus wieder an die RNA binden und diese ins Zytoplasma transportieren (Abbildung 1.5 (6)) (zusammengefasst in (Cullen, 1998b)).

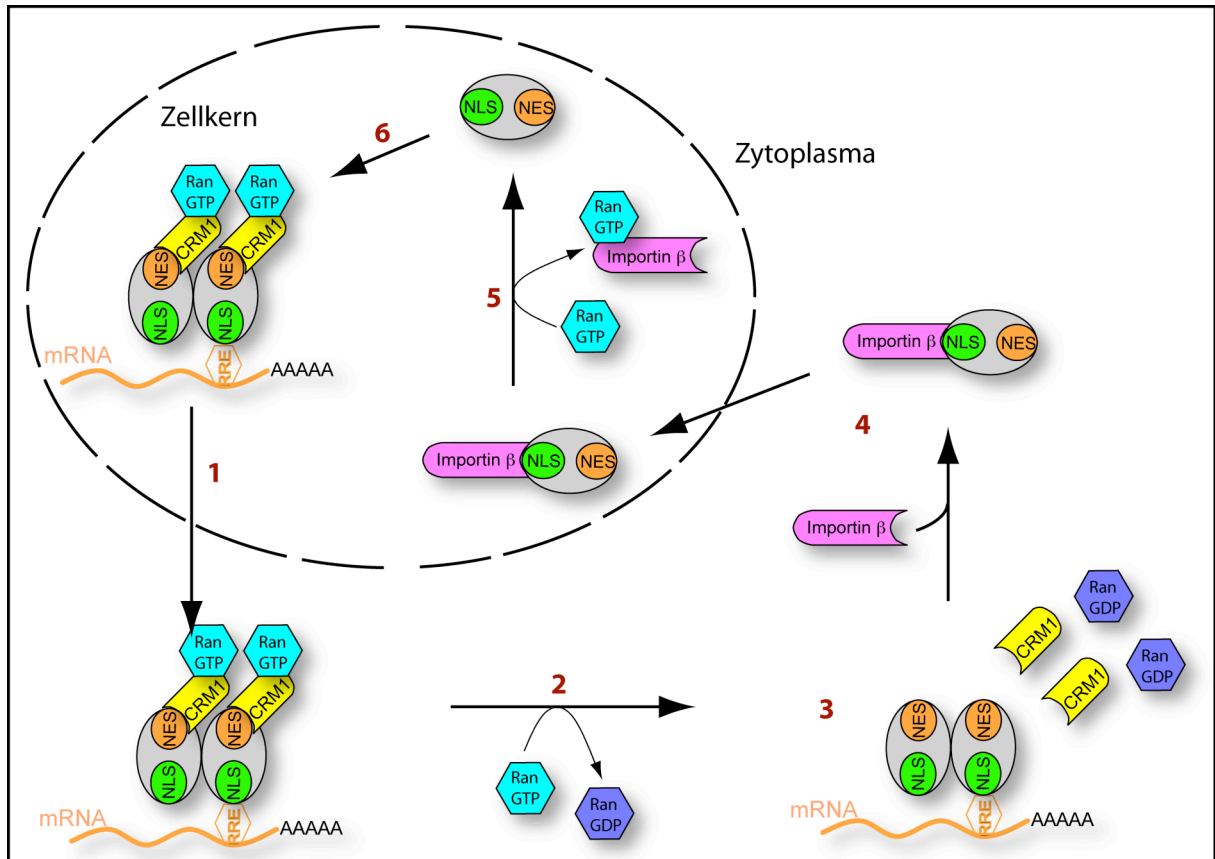


Abbildung 1.5.: Funktionsweise von Rev beim RNA-Transport

(1) Rev bindet an die RRE auf der mRNA. RanGTP-gebundenes CRM1 interagiert anschließend mit der Rev-NES und transportiert diesen Komplex durch den Kernporenkomplex. (2) Im Zytoplasma wird RanGTP zu RanGDP hydrolysiert. (3) Dies verursacht die Freisetzung der mRNA von CRM1 für die Translation. (4) Importin-β bindet an Rev und transportiert es zurück in den Zellkern. (5) Im Kern interagiert RanGTP mit Importin-β und verursacht die Freisetzung von Rev, welches (6) im nächsten Zyklus wieder an die RNA bindet und den Transport vermitteln kann.

1.5. HIV-1 Rev in humanen Astrozyten

HIV befällt neben Lymphozyten auch Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Neben Mikroglia und Makrophagen werden auch Astrozyten infiziert (Brack-Werner, 1999; Kramer-Hammerle *et al.*, 2005b). Neueste Studien zeigen, dass ebenfalls adulte, neurale Stammzellen, die sich in Astrozyten, Oligodendrozyten bzw. Neuronen differenzieren können, von HIV-1 infiziert werden (Rothenaigner *et al.*, 2007).

Die Virusreplikation ist in humanen Astrozyten im Vergleich zu z.B. T-Zellen stark vermindert. Die chronisch infizierte Astrozytomzelllinie TH4-7-5 zeigt eine deutlich

geringere Produktion des viralen Strukturproteins p24. Northern Blot Analysen zeigten, dass nur geringe Mengen an ungespleißten bzw. einfach gespleißten Transkripten vorliegen (Brack-Werner *et al.*, 1992; Neumann *et al.*, 1995). Eine wichtige Ursache für die geringe Virusreplikation ist die um etwa 90 % verminderte Transaktivierungsfunktion von Rev in infizierten Astrozyten im Vergleich zu HIV-permissiven Kontrollzellen (z.B. HeLa-Zellen) (Ludwig *et al.*, 1999). Das Rev-Protein ist jedoch in HIV-1 infizierten Astrozyten vorhanden (Neumann *et al.*, 1995). Außerdem ist bekannt, dass die RNA-Bindung und die Oligomerisierung von Rev in Astrozyten vollständig funktioniert (van Empel, 2000). Die intrazelluläre Lokalisation des Rev-Proteins in Astrozyten ist gegenüber HIV-permissiven HeLa-Zellen deutlich verändert. In HeLa-Zellen ist Rev bis zu 90 % im Zellkern, insbesondere in den Nukleoli lokalisiert. In Astrozyten ist Rev jedoch nur zu etwa 30 % im Zellkern vorhanden (Neumann *et al.*, 2001). Demnach besitzt Rev in Astrozyten und HeLa-Zellen (aktive HIV-1 Produzenten) unterschiedliche biologische Aktivitäten.

Dem HIV-1 Rev-Protein wird eine Beteiligung an der Translation viraler Strukturproteine und Enzyme zugeschrieben (Arrigo and Chen, 1992 a; D'Agostino *et al.*, 1992). In Astrozyten wurde beschrieben, dass die Translationsaktivität herabgesetzt ist und dies ein Grund für die geringe Produktion viraler Strukturproteine sein könnte (Gorry *et al.*, 1999).

Für die HIV-1 Replikation sind mehrere zelluläre Co-Faktoren beschrieben. Zwei dieser Faktoren, die in der Lage sind mit dem Rev-Protein zu interagieren, sind die Proteine Sam68 (Li *et al.*, 2002) und DDX1 (Fang *et al.*, 2004). Für Sam68 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in der Astrozytomzelllinie U87.MG in geringeren Mengen vorkommt und seine Expression nach einer HIV-Infektion weiter abnimmt. Nach Überexpression von Sam68 in dieser Zelllinie konnte die HIV-1 Produktion erhöht werden. Somit scheint Sam68 die verminderte HIV Produktion in U87.MG Zellen wieder anheben zu können (Li *et al.*, 2002). Der Vergleich von Astrozyten und HeLa-Zellen deutet darauf hin, dass das DDX1-Protein in Astrozyten stärker im Zytoplasma lokalisiert. Die Überexpression von DDX1 zusammen mit RevGFP in Astrozyten führte zu einer Anreicherung des RevGFP-Proteins im Zellkern der Zellen. Zudem konnte nach Überexpression von DDX1 eine erhöhte Virus Produktion gemessen werden (Fang *et al.*, 2005). Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass DDX1 ein wichtiger Co-Faktor für die Rev Lokalisation und Funktion in Astrozyten ist.

Die Ergebnisse beider Untersuchungen stellen weitere Erklärungsmöglichkeiten für die verringerte Virusreplikation in Astrozyten dar.

Nachdem die Ursache für die verminderte Virusproduktion in Astrozyten nicht vollständig geklärt ist, müssen kombinierte Effekte in Betracht gezogen werden.

1.6. Zelluläre Interaktionspartner von HIV-1 Rev

Die Interaktion von Rev mit zellulären Proteinen wurde mit Hilfe von unterschiedlichsten Methoden adressiert. Diese waren Two-Hybrid Analysen, in vitro „Pull-down“ Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen, „cross-linking“ Analysen mit Rev-Peptiden, Kolkalisationsexperimente und Co-Immunpräzipitationen mit Zell-extrakten, die das Rev Protein und das zu untersuchende Protein überexprimierten. Die bekannten zellulären Rev-interagierenden Proteine sind in der „human protein interaction database“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/HIVInteractions/rev.html>) zusammengestellt. Im Folgenden werden diese, bereits publizierten Rev-interagierenden Faktoren im Überblick beschrieben. Eine Zusammenfassung dieser Daten ist im Anhang (siehe Anhang Abschnitt 10.2, Tabelle 10.1) dargestellt.

An die NLS des Rev-Proteins binden die Proteine B23, Importin- β , Importin-5, Importin-7, Transportin und p32. Mit Hilfe von Affinitätschromatographie-Analysen mit rekombinantem Rev und Importin- β konnte die Bindung von Rev an **Importin- β** gezeigt werden (Arnold *et al.*, 2006; Henderson and Percipalle, 1997; Truant and Cullen, 1999). Dabei bindet Importin- β an die NLS von Rev, da keine Interaktion von Importin- β mit der Rev M6 Mutante (Malim, 1989) gezeigt werden konnte. Importin- β vermittelt den Import von HIV-1 Rev. Des Weiteren konnte in Affinitätschromatographie-Studien gezeigt werden, dass Rev über seine NLS-Domäne mit weiteren Transportproteinen (**Transportin**, **Importin-5** und **Importin-7**) interagiert. Diese Interaktionen sollen den Kernimport des Rev-Proteins unterstützen (Arnold *et al.*, 2006). Das Protein **B23** (Nucleophosmin 1) interagiert in Säulenchromatographie-, Sucrosegradient- bzw. Equilibrium Dialyse-Untersuchungen mit dem Rev-Protein (Fankhauser *et al.*, 1991; Szebeni *et al.*, 1995). Durch die Verwendung eines NLS-Peptids wurde die Interaktionsdomäne auf die NLS festgelegt. Es ist gezeigt, dass B23 den Kernimport von Rev stimuliert (Szebeni *et al.*, 1997) und Aggregationen des

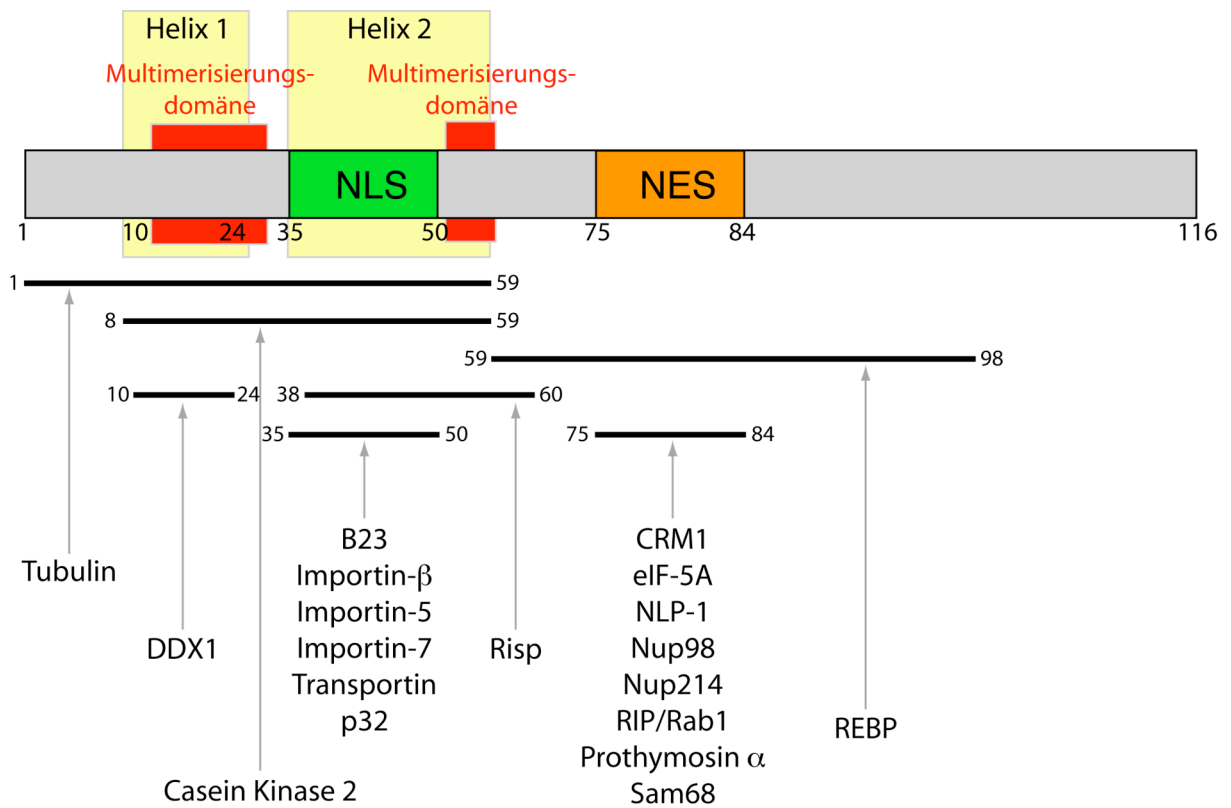
Rev-Proteins entgegenwirkt (Szebeni and Olson, 1999). Die Bindung des humanen **p32**-Proteins an das Rev-Protein konnte in GST-Affinitätschromatographie-Analysen gezeigt werden. Die NLS des Rev-Proteins war für die Bindung verantwortlich (Luo *et al.*, 1994; Tange *et al.*, 1996). P32 ist in der Lage als Gegenspieler zu SF2/ASF das Spleißen von HIV Transkripten zu inhibieren (Zheng *et al.*, 2003).

An die Aminosäuren 38 – 60 bindet das **Risp**-Protein, ein erst kürzlich identifizierter Rev-interagierender Faktor. Die Untersuchungen wurden durch Y2H, M2H und Kolokalisationsexperimente durchgeführt. Das Risp-Protein ist in der Lage die Rev-Funktion zu inhibieren (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005a).

Für die NES-Domäne, welche für den Kernexport von Rev notwendig ist, sind viele Rev-interagierende Proteine bekannt. Diese Proteine sind CRM1, eIF-5A, diverse Proteine des Kernporenkomplexes (NLP-1, Nup98, Nup214 und RIP/Rab1), Prothymosin α und Sam68. In mehreren Untersuchungen (Y2H, M2H, in vitro Affinitätschromatographie, und Kolokalisation) konnte die Interaktion von Rev mit **CRM1** gezeigt werden (Askjaer *et al.*, 1998; Bogerd *et al.*, 1998; Fornerod *et al.*, 1997; Neville *et al.*, 1997; Zolotukhin and Felber, 1999). Diese Interaktion konnte durch Verwendung der Rev M10 Mutante (Malim, 1989) auf die NES-Region des Rev-Proteins eingegrenzt werden. Die Interaktion zwischen den Proteinen Rev und CRM1 ist essentiell für den Kernexport. Die Bindung des Proteins **eIF-5A** an ein Rev-NES-Peptid konnte mittels „Cross-linking“ Experimenten, BIAcore- und Affinitätschromatographie-Analysen gezeigt werden (Hofmann *et al.*, 2001; Ruhl *et al.*, 1993). Dieses Protein ist für den Export von Rev wichtig. Die Nukleoporene **NLP-1**, **Nup98**, **Nup214** und **RIP/Rab1** interagierten in mehreren Untersuchungen mit HIV-1 Rev (Bogerd *et al.*, 1995; Farjot *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 1995; Kiss *et al.*, 2003; Stutz *et al.*, 1996; Stutz *et al.*, 1995; Zolotukhin and Felber, 1999). Die Proteine des Kernporenkomplexes sind am Exportvorgang durch die Kernporen wesentlich beteiligt. Das KH-Domäne Protein **Sam68** interagiert in Co-Immünpräzipitationen mit dem Rev-Protein (Li *et al.*, 2002). Sam68 fördert den Kernexport des Rev-Proteins und steigert die HIV-1 Replikation. Ein weiteres Protein, das den Kernexport induzieren konnte, ist **Prothymosin α** . In Affinitätschromatographie-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein mit der NES des Rev-Proteins interagiert (Kubota *et al.*, 1995).

Außerhalb der NLS und NES sind noch weitere zelluläre Rev-interagierende Faktoren bekannt. Die Proteine DDX1, DDX3 und DDX24 der Klasse der DEAD box RNA Helikasen binden an das Rev-Protein. **DDX1** bindet an die Aminosäuren 10 – 24 von HIV-1 Rev. Diese Bindung wurde mittels Y2H, M2H, Affinitätschromatographie und Immunpräzipitation nachgewiesen. Es wird postuliert, dass diese Interaktion für die Rev-RRE-Bindung und für die Rev-Lokalisation wichtig ist (Fang *et al.*, 2004). In Immunpräzipitationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Proteine Rev und **DDX3** miteinander interagieren. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass DDX3 mit CRM1 interagiert. Demnach könnte der Komplex aus Rev, CRM1 und DDX3 wichtig für den Kernexport sein (Yedavalli *et al.*, 2004). Eine Interaktion zwischen dem Rev-Protein und **DDX24** wurde mittels Co-Immunpräzipitation gezeigt. Die Verminderung der DDX24-Expression führte zur Freisetzung von Viren, die weniger infektiös waren im Vergleich zur Negativkontrolle. Hierbei spielt DDX24 eine wichtige Rolle bei der Verpackung der viralen RRE-RNA in Viruspartikel (Ma *et al.*, 2008). In einer weiteren Studie konnte die Interaktion zwischen den Proteinen **Hax-1** (HS1-associated protein X-1) und Rev nachgewiesen werden (Modem and Reddy, 2008). In dieser Arbeit wurde die Inhibierung der Rev-abhängigen RRE-vermittelten Genexpression durch Hax-1 beobachtet. Das Rev-Protein bindet des Weiteren an eine C-terminal veränderte Variante des NF90-Proteins (**NF90ctv**). NF90ctv inhibierte den Rev-vermittelten RNA-Transport durch die Interaktion mit HIV-1 Rev (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2006). Ein Kinesin-ähnliches Protein **REBP** (Rev/Rex effektor binding protein) interagiert in Y2H und Immunpräzipitationsanalysen mit den Aminosäuren 59-98 von Rev. Hierbei gehen die Autoren von einer Koaktivierung des Rev-Proteins zusammen mit RIP/Rab aus (Venkatesh *et al.*, 2003). In Mutationsanalysen, konnte die Rev-Bindungssequenz für das Protein **Casein Kinase 2** auf die beiden Helices von Rev eingegrenzt werden (Meggio *et al.*, 1996). Casein Kinase 2 ist wichtig für die Phosphorylierung der beiden Serine im N-Terminus von Rev. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Rev ebenfalls mit dem Zytoskelett interagiert. Rev ist in der Lage mit **Tubulin** so genannte Rev-Tubulin-Toroide (RTT) auszubilden. Eine 1 – 59 Mutante des Rev-Proteins konnte ebenfalls RTTs ausbilden. Somit konnte die Bindungsdomäne auf diese Aminosäuren eingegrenzt werden (Watts *et al.*, 2000). Diese Interaktion führt zu einer Depolymerisierung und Destabilisierung von Mikrotubuli.

Abbildung 1.6 zeigt bekannte Rev-interagierende Faktoren und die entsprechenden Rev-Protein-Domänen, mit welchen die zellulären Proteine interagieren.



DDX3, DDX24, Hax-1 und NF90ctv: Interaktionsdomäne unbekannt (s. Anhang 10.2 / Tabelle 10.1)

Abbildung 1.6.: Zusammenstellung Rev-interagierender zellulärer Faktoren

In der Literatur beschriebene Rev-interagierende Faktoren sind in dieser Abbildung dargestellt. Die jeweiligen Rev-Protein-Domänen, mit welcher die zellulären Proteine interagieren, sind schematisch abgebildet. Eine detaillierte Aufstellung der Interaktionen ist im Anhang Abschnitt 10.2, Tabelle 10.1 zusammengestellt.

1.7. Wichtige Eigenschaften von hnRNP-Proteinen

In Abschnitt 1.6 wurden zelluläre Proteine, welche mit dem Rev-Protein interagieren, zusammengefasst. Darüber hinaus existieren viele zelluläre Proteine, die mit der HIV-1 RNA interagieren und die HIV-1 Replikation beeinflussen können (Stoltzfus and Madsen, 2006). Eine große Gruppe von RNA-bindenden Proteinen, die einen Einfluss auf die HIV-1 Replikation haben, sind die hnRNP Proteine. In diesem Abschnitt werden einige wichtige Eigenschaften dieser Gruppe beschrieben.

HnRNP Proteine (hnRNP A – U), welche auch als „Histone der RNA“ bezeichnet werden, gehören zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen im Zellkern von Metazoen. Sie sind in der Lage die prä-mRNA zu verpacken, indem mehrere hnRNP-Proteine kooperativ an RNA-Segmente von etwa 500 Nukleotiden binden (Reed and Magni, 2001). Die hnRNP Proteine bilden dabei so genannte hnRNP-Partikel, die jeweils eine Größe von etwa 30S besitzen. Die hnRNP-Partikel sind vom Spleißosom ausgespart und im Zellkern gleichmäßig verteilt. Bei hnRNP Proteinen sind zwei Typen von RNA-Bindungsmotiven bekannt. Zum einen besitzen hnRNP-Proteine RRM (RNA recognition motif)-Domänen (z.B. hnRNP-A1, hnRNP-Q, hnRNP-R), zum anderen KH (K-homolog)-Domänen (hnRNP-K, hnRNP-E1 und hnRNP-E2). Neben den klassischen RNA-Bindungsdomänen besitzen hnRNP Proteine auch RGG (Arginin-Glycin-Glycin)-Wiederholungen als RNA-Bindungsmotive. Es gibt hnRNP-Proteine, die zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma „shutteln“ (z.B. hnRNP-A1, I oder K) können, wohingegen andere in der Regel im Zellkern lokalisieren (z.B. hnRNP-C). Diese unterschiedliche Verteilung der hnRNP Proteine innerhalb der Zelle ergibt sich aus den diversen Funktionen, welche die einzelnen hnRNP Proteine ausüben (zusammengefasst in (Dreyfuss *et al.*, 2002; Reed and Hurt, 2002; Reed and Magni, 2001)).

HnRNP Proteine besitzen viele Funktionen in der Zelle. Sie sind an der Regulation der Transkription, am alternativen Spleißen, an der Prozessierung des 3'-Endes, an der Erhaltung der Telomerlänge, an der Genrekombination von Immunglobulinen und an der mRNA-Stabilität beteiligt. Zudem sind hnRNP Proteine, die in der Lage sind zu „shutteln“ (z.B. hnRNP-A1 oder K), an zellulären Prozessen des mRNA Exports, der Regulation der Translation bzw. der zytoplasmatischen mRNA Degradation beteiligt (zusammengefasst in (Dreyfuss *et al.*, 2002; Kim and Dreyfuss, 2001)).

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Die biologischen Aktivitäten von Rev unterscheiden sich in Astrozyten und HeLa-Zellen. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von bisher unbekanntem Rev-interagierenden Proteinen in Astrozyten und die Analyse der Interaktion dieser Faktoren mit Rev in HeLa-Zellen. Schließlich sollte der Einfluss der neuen Rev-Interaktoren auf die Rev-Funktion im Rev-Reportersystem und auf die HIV-1 Replikation in verschiedenen chronisch infizierten Zelltypen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Puffer

Produkte (Hersteller)	Zusammensetzung
Anhydrotetracyclin in Dimethylformamid	2 mg/ml Anhydrotetracyclin in DMF
Auftragspuffer für DNA	15 % Ficoll, 5 mM EDTA, 0,01 % Bromphenolblau, 0,01 % Xylenxyanol
Glycin-Lösung	1 M Glycin (w/v) in H ₂ O
IPTG Lösung 0,2 %	0,2 % IPTG (w/v) in H ₂ O
IPTG Lösung 1 M	1 M IPTG (w/v) in H ₂ O
Lysispuffer für eukaryotische Zellen (<i>Strep</i> TagII-Affinitätschromatographie)	20 mM Tris/HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 Protease-Inhibitortabletten
Lysispuffer für eukaryotische Zellen (Immunpräzipitation)	1 x TBS pH 7,4 1 % Triton X-100 2 mM EDTA 10 mM EGTA 10 mM Na ₂ P ₂ O ₇ 1,2 % PIM 0,44 % PMSF Phosphatase-Inhibitor-Cocktail
Lysispuffer für prokaryotische Zellen	100 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 mg/ml Lysozym Protease-Inhibitortabletten
PBS (Phosphat gepufferte Saline) pH 7,4	140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 9,7 mM Na ₂ HPO ₄ ·2·H ₂ O, 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T pH 7,4	PBS mit 0,1 % Tween-20
SDS-Lösung (10%)	10 % Natriumdodecylsulfat (w/v) in H ₂ O

StrepTagII Wasch- und Elutionspuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,0 250 mM, 500 mM oder 1,5 M NaCl 1 mM EDTA
Stripping Puffer	0,2 M Glycin, 0,1 % SDS pH 2,2
TAE (50x)	2 M Tris-Acetat, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl
X-Gal Lösung	2 % X-Gal in 100% N,N-Dimethylformamid

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Produkte	Hersteller
2 log DNA Ladder	New England Biolabs, Schwalbach
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Anhydrotetracyclin (ATC)	Sigma, Deisenhofen
Antibiotika-Antimykotika-Lösung (Gibco, Karlsruhe)	10000U/ml Penicillin G 10000µg/µl Streptomycin 25 µg/µl Amphotericin B
Aqua bidest. (Milli-Q)	Millipore, Schwalbach
β-Mercaptoethanol	Stratagene, Amsterdam, NL
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Schwalbach
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Schwalbach
dNTPs (Einsatz: je 125 µM Endkonzentration)	Promega, Madison, USA
DMF	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (1% w/v)	Serva, Heidelberg
FACS Flow, Clean und Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fötiales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
FuGENE™ HD Transfektionslösung	Roche Diagnostics, Mannheim

Geneticin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
HCl	Neolab, München
IPTG	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MES-Puffer (20x) Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd (eingesetzt: 2% in PBS)	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/ <i>Streptomycin</i> -Lösung (Gibco, Karlsruhe)	10000U/ml Penicillin G 10000µg/µl Streptomycin
Proteinstandard (SeeBlue Plus 2)	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
SDS	Sigma, Deisenhofen
SeaKem® LE Agarose	FMC Bio Products, Rockland, USA
SDS-Auftragspuffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Transferpuffer für Western Blot (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA Lösung (0,05 %-ge Lösung)	Biochrom AG, Berlin; Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma, Deisenhofen

2.1.3. Kits

Produkte	Hersteller
Bradford Reagenz	Biorad, München
Colloidal Coomassie Stain Kit (Lösung A + B)	Invitrogen, Karlsruhe
Expand High Fidelity PCR Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
HIV-1-p24-Antigen ELISA	Beckman Coulter, Krefeld
NucleoBond Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond PC 500 Kit	Macherey-Nagel, Düren

Nucleospin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
RQ1 DNase Kit	Promega, Madison, USA
<i>Strep</i> TagII Reinigung Pufferset	IBA GmbH, Göttingen
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4. Medien

Produkte (Hersteller)	Zusammensetzung
DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) mit Glutamax-I (L-Analyl-L-Glutamin), 4,5 g/l Glucose und Pyruvate	Gibco, Karlsruhe
Einfrier-Medium für prokaryotische Zellen	2 Teile 80% Glycerin, 1 Teil 10 mM MgCl ₂
Einfrier-Medium für eukaryotische Zellen	DMEM, 20% FCS, 1% Penicillin/ <i>Streptomycin</i> , 10% DMSO
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar
LB-Ampicillin Platten	LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Medium (nach Luria-Bertani)	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, Aqua dest. auf 1 L, pH 7,0
LB-Ampicillin-Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
Medium für eukaryotische Zelllinien	DMEM, 10% FCS, 1% Antibiotikum/Antimykotikum
Medium für HIV-1 infizierte Zelllinien	RPMI, 10% FCS, 1% Penicillin/ <i>Streptomycin</i>
RPMI 1640 Medium mit 2,0 g/l NaHCO ₃ und stabilem Glutamin; low endotoxin	Biochrom AG, Berlin
SOC-Medium (Gibco, Karlsruhe)	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

2.1.5. Verbrauchsmaterialien

Produkte	Hersteller
6-, 12-, 24- Loch Platte	Nunc International, Wiesbaden
Amicon Ultra Protein Konzentratorsäulen, 4 ml und 15 ml Arbeitsvolumen, 5 kDa Ausschlussgrenze	Millipore, Schwalbach
Bis-Tris-Acrylamid-Fertiggele 4-12%	Invitrogen, Karlsruhe
Eppendorf tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon [®] 15 ml und 50 ml tubes	BD Biosciences, Heidelberg
Filter 0,2 µm und 5 µm	NeoLab, München
Filterpapiere für Western Blot	BioRad, München
Glasboden Petrischalen	MatTek, Asland, USA
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Ibidi-Mikroskopierschälchen	Ibidi GmbH, Martinsried
Immersionsöl (Immersol 518 F)	Carl Zeiss, Oberkochen
Nitrocellulose Membran 0,45 µm	BioRad, München
Nunc Cryo Tube [™] Vials	Nunc International, Wiesbaden
Nunc Solo Flask T25, T75 und T175	Nunc International, Wiesbaden
Sepharose- <i>Strep</i> Tactin Säulen, 5 ml Volumen	IBA, Göttingen
Zählkammer (Fast Read 106)	Madaus Diagnostics, Köln

2.1.6. Geräte

Geräte und Hersteller
<p>Axiovert 25 von Carl Zeiss, Jena</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Fluoreszenz</u>: Quecksilberlampe HBO 50AC ▪ <u>Filtersätze</u>: <ul style="list-style-type: none"> ○ Hoechst 33342 (BP 365, FT 395, LP 420) ○ GFPsg143 (BP 450-490, FT 510, LP 515) ○ DsRed (BP 550-580, FT580-720, LP 590-650) ▪ <u>Objektive</u>: 5x/0.12, 10x/0.25, 20x/0.3 und 32x/0.4, Achroplan, Phase1
<p>Cell Observer (Axiovert 200) von Carl Zeiss, Jena</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ AxioCam gekühlte CCD Kamera ▪ Inkubationskammer 37°C, 5% CO₂, ▪ Luftbefeuchtung ▪ Fluoreszenz von einer HBO 103 W/2 Quecksilberlampe

<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Filtersätze:</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ Red „00“ - Extinktion: 530-585 FT 600 - Emission: LP 615 ○ CFP „47“ - Extinktion: 436/20 FT 455 - Emission: BP 480/40 ○ YFP „46“ - Extinktion: 500/20 FT 515 - Emission: BP 535/30 ▪ <u>Objektive:</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ Plan Neofluar 10x, Numerische Apertur: 0,3, Phase1, Luftimmersion ○ LD Apochromat 20x, Numerische Apertur: 0,4, Phase2, Luftimmersion ○ LD Achroplan 40x, Numerische Apertur: 0,6, Phase2, Luftimmersion ○ Plan Neofluar 40x, Numerische Apertur: 1,3, Phase3, Ölimmersion ○ Plan Apochromat 63x, Numerische Apertur: 1,4, Phase3, Ölimmersion ▪ Microsoft PC mit Axiovision 4.6.3. zur Steuerung des Mikroskops 	
Cecil Ce 1010 Spektralphotometer	Cecil Instruments, Cambridge, UK
ChemiDoc Geldokumentationsanlage mit Software Quantity One Vers. 2.4.1. + 4.6.2.	BioRad, München
FACScalibur Durchflußzytometer <ul style="list-style-type: none"> ▪ Anregungslaser: 488nm, 15mW ▪ Fluoreszenz-Detektoren: <ul style="list-style-type: none"> ○ FL-1 (BP 530/30) ○ FL-2 (BP 585/30) ○ FL-3 (LP 650) ▪ Angeschlossenes Sortierungs-Modul 	BD Biosciences, Heidelberg
Hettich Rotanta/TR Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Infors Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Labsonic 2000 Ultraschallgerät	B.Braun, Melsungen
Master Cycler gradient 5331	Eppendorf, Hamburg
Microplate Reader Model 680	BioRad, München
SmartSpec Plus Spektrophotometer	BioRad, München
Sigma 1-15 Tischzentrifuge	Sigma, Osterode
Thermomixer 5435	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot SD SemiDry Transfer Blot	BioRad, München
Transilluminator 312 nm zum Sichtbarmachen von DNA-Banden in Agarosegelen für präparative Zwecke	Bachofer
Western Blot Entwicklermaschine	Kodak, München

2.1.7. Antikörper

Name	Eingesetzte Menge (WB)	Hersteller
Maus- α B23	1 : 500	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen- α CK2	1 : 2500	AbD Serotec, Düsseldorf
Maus- α CRM1	1 : 1000	BD Biosciences, Heidelberg
Maus- α eIF5A	1 : 10000	BD Biosciences, Heidelberg
Maus- α GAPDH	1 : 10000	Chemicon, Hampshire, UK
Ratte- α GFP (Zellkulturüberstand)	1 : 50	Dr. Elisabeth Kremmer
Kaninchen- α H2A	1 : 500	Abcam, Cambridge, UK
Maus- α hnRNP-A1	1 : 500	Sigma, Deisenhofen
Maus- α hnRNP-E1	1 : 2000	Acris Antibody, Herford
Maus- α hnRNP-E2	1 : 300	Acris Antibody, Herford
Kaninchen- α hnRNP-K	1 : 2000	Novus, Littleton, USA
Maus- α hnRNP-Q	1 : 500	Sigma, Deisenhofen
Kaninchen- α hnRNP-R	1 : 500	Abcam, Cambridge, UK
Maus- α hnRNP-U	1 : 2000	Abcam, Cambridge, UK
Ratte- α Imp β	1 : 1000	Biozol, Eching
Kaninchen- α NAP1L1	1 : 500	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen- α Nucleolin	1 : 2500	Sigma, Deisenhofen
Maus- α PARP	1 : 1000	Zymed (Invitrogen)
Maus- α PABP1	1 : 2500	Sigma, Deisenhofen
Ratte- α Rev (Zellkulturüberstand)	1 : 50	Dr. Elisabeth Kremmer
Maus- α RNAPol-II (gereinigt)	1 : 1000	Dr. Elisabeth Kremmer
Ziege- α Kaninchen-HRPO	1 : 10000	Dianova, Hamburg
Ziege- α Maus-HRPO	1 : 10000	Dianova, Hamburg
Ziege- α Ratte-HRPO	1 : 10000	Dianova, Hamburg
Kaninchen- α GFP	für Immunpräzipitationen Konzentration: 2 μ g/ μ l	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8. Oligonucleotid-Primer

Nummer	Name	Sequenz (5'- 3')
1	5'-Rev-SacII-NdeI	ATCATATGCCGCGGGCGCGCAAGAAATGGC AAGCGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACG
2	3'-GFP- <i>Strep</i> -NheI-EcoRI	TGAATTCTCTAGATTACTTCTCGAACTGGGG GTGGCTCCAGTTTCCGGCACCGCTCTTGTAC AGCTCGTCCATGCCGTGAGTGAT
3	Komp. GFP-Primer 1	GGGCGCGCAAGAAGGAATGG
4	Komp. GFP-Primer 2	CTAGCCATTCTTCTTGC GCGCCCGC
5	5'-SacII-hnRNPA1-(1.Teil)	ATCCGCGGGCGCGCAAGAAATGTCTAAGTCA GAGTCTCCTAAAGAGCCC
6	5'-SacII-hnRNPA1-(2.Teil)	ATCCGCGGGCGCGCAAGAAATGGTGAATGG CCACGACTGTGAAGTTAGAAAAGCC
7	3'-NheI-hnRNPA1-(1.Teil)	ATTCTAGAGCTAGCAGCCATCTCTTGCTTTGA CAGGGC
8	3'-NheI-hnRNPA1-(2.Teil)	ATTCTAGAGCTAGCTCCAAATCTTCTGCCACT GCC
9	3'-NheI-EcoRI-Stop-hnRNPA1	ATGCTAGCGAATTCTTATCCAAATCTTCTGCC ACTGCC
10	5'-NheI-hnRNPQ	ATATGGCTAGCGCTACAGAACATGTTAATGG
11	3'-XbaI-NheI-hnRNPQ	ATTCTAGATTAGCTAGCCTTCCACTGTTGCC AAAAGTATCC
12	5'-BsaI-Rev	ATGGTCTCGAATGGCTAGCGCAGGAAGAAG CGGAGACAGCGACG
13	5'-BsaI-GFP	ATGGTCTCGAATGGCTAGCAAGGGCGAGGA GCTGTTACCGG
14	3'-BsaI-GFP	ATGGTCTCAGCGCTACCGCTCTTGTACAGCT CGTCCATGCCGTGAGTGAT
15	5'-BsaI-Δ2-8-Rev	ATGGTCTCGAATGGCTAGCACAGTCAGACTG ATCAAGCTTCTCTATCAAAGC
16	5'-BsaI-Δ2-17-Rev	ATGGTCTCGAATGGCTAGCGACGAAGAGCTC ATCAGAACAGTCAGACTGATCAAGC

2.1.9. Software

Software	(Hersteller)
Adobe Acrobat 7.0 + 8.0	Adobe Systems, USA
Adobe Illustrator CS2 + CS3	Adobe Systems, USA
Adobe Photoshop CS2 + CS3	Adobe Systems, USA
AxioVision 4.6.3.	Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos
Cell Quest Pro	BD Biosciences, Heidelberg

CLC Free Workbench 4.6	CLC bio, Cambridge, MA, USA
Endnote X	Thomson ISI ResearchSoft
FlowJo 8.2.	Tree Star Inc., Ashland OR, USA
Gene Construction Kit 2.5	Textco Inc., New Hampshire, USA
Genomatix Software	Genomatix, München
IPLab 4.0 zur Bildbearbeitung	Scanalytics, Fairfax, USA
MacVector 9	Accelrys, SanDiego, USA
MacOSX Tiger 10.4.10 / Leopard 10.5.1	Apple Computer Inc., Cupertino, USA
Microsoft Word und Excel 2004	Microsoft, Unterschleißheim
Prism 4.0b	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Quantity One 2.4.1. und 4.6.2.	BioRad, München

2.1.10. Plasmide

2.1.10.1. Eukaryotische Expressionsvektoren

pFRED143

Das sg143 *gfp*-Gen (Stauber and Horie 1998) in diesem GFP-Expressionsplasmid steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und enthält das SV40-Polyadenylierungssignal. Das hier verwendete GFP fluoresziert durch die Mutationen T66C, Y107F, I168T und L232H deutlich intensiver als das Wildtyp-GFP (Dr. Neumann, GSF).

pCsRevsg143

Das aus pBsRev amplifizierte sRev wurde in pFred143 (Stauber, 1998b) kloniert. In diesem Konstrukt unterliegt sRev der Kontrolle des CMV-Promotors und ist an GFP gekoppelt. Das GFP besitzt kein eigenes Startcodon und kann somit nur zusammen mit Rev exprimiert werden (Dr. Neumann, GSF).

pCsRevGFP-StrepTagII

Mittels PCR (Primer 1 und 2) wurde in diesem Konstrukt das *StrepTagII* an das RevGFP-Gen fusioniert. Dieses Plasmid basiert auf dem Vektor pCsRevsg143.

pCGFP-StrepTagII

Das sRev aus pCsRevGFP-*StrepTagII* wurde durch *SacII* und *NheI* Verdau entfernt und der N-Terminus des GFP-Gens durch die komplementären Oligonukleotide 3 und 4 aufgefüllt.

pC Δ 2-8sRevGFP

Dieses Konstrukt stellt einen Expressionsvektor für eine N-terminale Deletionsmutante von sRevGFP dar. Durch NheI Verdau wurde das sRev aus pCsRevsg143 entfernt und durch Δ 2-8sRev aus pASK-IBA3plus- Δ 2-8sRevGFP-*Strep*TagII ersetzt.

pC Δ 2-14sRevGFP

In diesem Konstrukt wurden die Aminosäuren 2 – 14 von sRev deletiert. Dies erfolgte durch identische Klonierung wie pC Δ 2-8sRev. Rev wurde hierbei durch Δ 2-14sRev aus pASK-IBA3plus- Δ 2-14sRevGFP-*Strep*TagII ausgetauscht.

pCR 2.1-TOPO®

Dieser Klonierungsvektor von Invitrogen liegt geöffnet mit 3'-überhängenden Thymidinresten und mit gebundener Topoisomerase vor.

pCTat

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

pLRed(2xINS)R

Dieses Plasmid enthält die DNA-Sequenz für das rot fluoreszierende Protein *DsRed1* (Bevis and Glick, 2002) unter der Kontrolle der HIV-1 LTR und kann mittels Tat aktiviert werden. Nach der *DsRed1* Sequenz wurde ein Translations-Stopcodon eingebaut. Zusätzlich wurde ein Bereich aus dem HIV-Genom (Nukleotide 379-1424) zweimal hintereinander nach dem Stopcodon eingefügt. Diese Sequenz entspricht der p17/p24 Genregion und hat durch die Instabilitätselemente (INS) einen inhibitorischen Effekt auf die mRNA-Expression. Schließlich enthält dieses Konstrukt die RRE-Sequenz. Eine Produktion des Reporterproteins *DsRed1* in Abwesenheit von Rev ist kaum möglich (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005a; Wolff, 2003; Wolff *et al.*, 2003; Wolff *et al.*, 2006a). Dieses Konstrukt wurde für die Funktionsanalyse in U138 eingesetzt.

exBIFC-Expressionskonstrukte

Die im Folgenden aufgeführten Plasmidkonstrukte enthalten die Expressionskassette für die Produktion unterschiedlicher Proteine in den exBIFC Vektoren pC-mRFP1-YFP-N bzw. pC-CFP-YFP-C. Die Klonierung erfolgte durch Insertion der DNA-Sequenz des jeweiligen Proteins zwischen den Schnittstellen SacII und NheI. Alle Vektoren besitzen einen CMV Promotor, der die Expression kontrolliert.

Die Konstrukte, die in dieser Arbeit hergestellt wurden, sind in der folgenden Tabelle gelb hinterlegt und enthalten Angaben zu den jeweils verwendeten Primern.

Plasmidkonstrukt	Gen zwischen SacII und NheI Schnittstelle
pC-mRFP1-YFP-N	-- (Hartl, GSF)
pC-CFP-YFP-N	-- (Hartl, GSF)
pC-sRev-mRFP1-YFP-N	sRev (Hartl, GSF)
pC-sRev-CFP-YFP-C	sRev (Hartl, GSF)
pC-hnRNPA1-CFP-YFP-N	hnRNPA1 (Primer 5 und 8); (diese Arbeit)
pC-hnRNPA1-1-CFP-YFP-N	Die ersten 178 Aminosäuren von hnRNPA1 (Primer 5 und 7); (diese Arbeit)
pC-hnRNPA1-2-CFP-YFP-N	Die letzten 143 Aminosäuren von hnRNPA1 (Primer 6 und 8); (diese Arbeit)
pC-hnRNPQ-CFP-YFP-N	hnRNPQ (Primer 10 und 11); dieses Insert wurde zwischen zwei NheI Schnittstellen kloniert (diese Arbeit)

2.1.10.2. Prokaryotische Expressionsvektoren

pASK-IBA3plus

Vektor für die Klonierung von Genen zur bakteriellen Expression (IBA GmbH Göttingen). Die Klonierung des Inserts erfolgte über BsaI Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende der multiple cloning site. Das eingefügte Insert wird im Leserahmen automatisch mit der *StrepTagII*-Sequenz versehen, so dass Proteine als *StrepTagII*-fusionierte Proteine exprimiert werden.

pASK-IBA3plus-sRevGFP-StrepTagII

Mit den Primern 12 und 14 wurde RevGFP in einer PCR mit BsaI Schnittstellen versehen und in den Vektor pASK-IBA3plus kloniert.

pASK-IBA3plus-GFP-StrepTagII

Mittels PCR (Primer 13 und 14) wurden BsaI Schnittstellen an GFP angehängt und in pASK-IBA3plus ligiert.

pASK-IBA3plus-Δ2-8sRevGFP-StrepTagII

Die N-terminalen Aminosäuren 2 – 8 von RevGFP wurden in einer PCR (Primer 15 und 14) entfernt und das Produkt über die eingefügten BsaI Schnittstellen in pASK-IBA3plus kloniert.

pASK-IBA3plus-Δ2-14sRevGFP-StrepTagII

Durch PCR (Primer 16 und 14) wurden die N-terminalen Aminosäuren 2 – 14 von RevGFP entfernt. Über die gleichzeitig eingefügten BsaI Schnittstellen wurde das Produkt in pASK-IBA3plus kloniert.

2.1.11. Bakterien

TOP10F'

Kompetente Zellen zur chemischen Transformation ($\text{cfu}=1 \times 10^8$ - $5 \times 10^9/\mu\text{g}$).

Dieser Stamm überexprimiert den Lac-Repressor (*lacIq*-Gen) für eine effektive Unterdrückung des lac-Promotors (Invitrogen, Karlsruhe). Für eine blau/weiß-Selektion, vermittelt durch das LacZ Protein, werden IPTG und X-GAL in den Agarplatten benötigt.

XL-10 Epicurian Coli® SoloPack™ Gold ultrakompetent (Stratagene)

Diesem *E. coli* Bakterienstamm fehlt die Endonuclease *EndA1*. Außerdem ist das *recA*-Gen mutiert, sodass eine Rekombinationsdefizienz vorliegt. Dadurch ist die inserierte Fremd-DNA im Plasmid stabiler.

Ultrakompetente Bakterien besitzen eine Transformationseffizienz von $\geq 5 \times 10^9$ cfu/ μg und wurden für Klonierungen verwendet.

BL21 codonplus (DE3)-RP (Stratagene)

Dieser Bakterienstamm eignet sich für die Überexpression von rekombinantem Protein. Die Transformationseffizienz liegt bei $> 1 \times 10^7$ cfu/ μg . Diesem Stamm fehlen die Lon Protease und die ompT (outer membrane Protease). Dadurch wird eine Degradation von Proteinen bei der Herstellung weitgehend vermieden. Sie sind Dcm Methylase positiv und Chloramphenicol resistent. Zudem enthalten sie das Gen für die Überexpression der T7 Polymerase, welches unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors steht und durch IPTG reguliert wird. Schließlich enthält dieser Stamm zusätzliche Kopien für die tRNA Gene *argU* (AGA, AGG) und *proL* (CCC). Diese Codone kommen in Bakterien selten vor. Daher werden sie in diesem Stamm stabil exprimiert, damit eukaryotische Codone des Fremd-Gens effizienter translatiert werden können.

2.1.12. Humane Zelllinien

HeLa

Humane epitheloide Zelllinie aus einem Cervix-Karzinom. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (CRL-7923).

85HG66

Humane Astrozytomzelllinie (Brack-Werner *et al.*, 1992; Stavrou *et al.*, 1989; Stavrou *et al.*, 1987), welche aus einem Gehirntumor stammt.

U138MG

U138MG ist eine humane Astrozytom-/Glioblastomzelllinie aus einem astrozytären Tumor III. Grades (Bagasra *et al.*, 1992; Bigner *et al.*, 1981; Chiodi *et al.*, 1987). Die Zellen wurden von ATCC bezogen (ATCC HTB-16).

HeLa-pHitRevGFP α -Klon

HeLa Zellklon, der das Fusionsprotein RevGFP stabil exprimiert. Die stabile Integration erfolgte mit Hilfe des pHit-Systems (Dr. Neumann, GSF).

Eine Subklonierung führte zu dem α -Klon, der das RevGFP fehlerfrei integriert hatte. Dieser Klon exprimiert funktionelles RevGFP (Dr. Wolff, GSF).

HeLa-GFP

HeLa-Zelllinie, welche stabil das fluoreszierende Protein GFP exprimiert.

HeLa-Tat-ROD

HeLa-Zelllinie, die stabil Tat exprimiert. Außerdem enthält sie stabil das Reporter-Konstrukt pLRed(2xINS)R, welches unter der Kontrolle der HIV-1 LTR steht und durch die Expression von Tat reguliert wird. Diese Zelllinie muss mit Rev supplementiert werden, damit DsRed1 exprimiert wird (Dr. Wolff, GSF) (Wolff, 2003).

TH4-7-5

Humane Astrozytomzelllinie (Brack-Werner *et al.*, 1992), welche chronisch HIV-1_{IIIb} infiziert ist.

LC5-HIV

Humane HeLa-Zelllinie (Mellert *et al.*, 1990), die chronisch HIV-1_{IIIb} infiziert ist.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Restriktionsverdau

Bei der Auswahl der Restriktionsendonukleasen wurde stets darauf geachtet, dass die Erkennungssequenz für das Enzym nicht methyliert war. Die enzymatische Reaktion erfolgte in dem vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Puffer und der angegebenen Temperatur. Wenn notwendig, wurde der Reaktion gereinigtes BSA-Protein zugefügt. Sollte die Spaltung mit mehreren Enzymen bei gleicher Temperatur erfolgen, wurde derjenige Puffer gewählt, in dem alle Enzyme die beste Aktivität besaßen. Bei analytischen Restriktionsverdauen wurden etwa 1 µg Plasmid-DNA mit 10 U der Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 50 µl für 1,5 Stunden inkubiert. Präparative Restriktionsverdauere wurden in einem Volumen von 50 µl etwa 2 Stunden durchgeführt. Dabei wurden 1 µg – 1,5 µg DNA und 20 U des Enzyms eingesetzt. Bei analytischen Verdauen wurden 20 µl der Reaktion, bei präparativen Verdauen der gesamte Ansatz auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

2.2.1.2. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 % und 2 % eingesetzt. Dabei wurde der Agarosegehalt des Gels mit zunehmender Größe der DNA-Fragmente reduziert. Eine 1%-ige Ethidiumbromid-Lösung wurde in einer Verdünnung von 1/10000 dem Gel (in TAE-Puffer gelöst) zugefügt. Der 1 x TAE-Laufpuffer enthielt ebenfalls Ethidiumbromid (1/10000 einer 1%-igen Lösung). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei Spannungen zwischen 80 und 120 V durchgeführt. Als Größenstandard wurde der 2-log Standard von New England Biolabs verwendet. Die Gele wurden in der ChemiDoc Geldokumentationsanlage (BioRAD) fotografiert.

2.2.1.3. DNA-Isolierung mittels Gelextraktion

DNA-Fragmente wurden aus präparativen Gelen isoliert. Hierbei wurden die DNA-Fragmente unter kurzer UV-Bestrahlung (< 5 Sekunden) auf einem Transilluminator bei 312 nm sichtbar gemacht und mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Für die Isolierung der DNA-Fragmente wurde das Nucleosin Extract II Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 30 µl H₂O eluiert.

2.2.1.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Polymerase Kettenreaktion wurde das High Fidelity PCR System von Roche verwendet. Dieses System verbindet die Taq-Polymerase mit einem zweiten Enzym, welches „*proofreading*“-Aktivität besitzt. Die Kombination dieser beiden Proteine sorgt für eine effiziente Ausbeute bei hoher Genauigkeit.

Die PCR Reaktion wurde typischerweise nach dem in Tabelle 2.1 dargestelltem Schema pipettiert:

Komponenten	Menge
Reaktionspuffer mit MgCl ₂ (10x)	5 µl
dNTP-Gemisch (je 1.25 mM Stammlösung)	8 µl
5' Primer (20µM)	2 µl
3' Primer (20µM)	2 µl
Template (30-50 ng)	1 µl
Enzym	0,75 µl
Wasser	ad 50 µl

Tabelle 2.1.: Zusammensetzung einer PCR-Reaktion

Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass der G/C-Gehalt hoch war und die Primer eine Schmelztemperatur von etwa 70°C besaßen. Die Elongationsdauer betrug je nach Größe des Amplifikats zwischen 30 und 120 Sekunden. Pro 500 Basen PCR-Amplifikat wurde die Elongationszeit um 30 Sekunden erhöht.

Im Folgenden ist das Profil für PCR-Reaktionen im Eppendorf PCR-Gerät dargestellt:

94°C	3 Minuten	Denaturierung der DNA	} 27 Zyklen
94°C	30-45 Sekunden	Denaturierung der DNA	
60°C	30 Sekunden	Annealing der Primer	
72°C	30-120 Sekunden	Elongation durch die Polymerase	
72°C	7 Minuten	Vervollständigung der Elongation	
4°C	unbegrenzt	Lagerung	

Die Effizienz jeder PCR-Reaktion wurde auf einem Agarose-Gel überprüft. Für die Klonierung wurde das PCR-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten, isoliert (siehe 2.2.1.3.) und mittels dem „TOPO-TA Cloning Kit“ kloniert.

2.2.1.5. TOPO-TA Klonierung

In Tabelle 2.2 ist die typische Zusammensetzung einer TOPO-TA-Klonierungsreaktion dargestellt.

Komponenten	Menge
Salt Solution	1 µl
H ₂ O	2 µl
PCR Produkt	2 µl
TOPO-TA-Klonierungsvektor	1 µl

Tabelle 2.2.: Zusammensetzung einer TOPO-TA-Klonierungsreaktion

Diese Reaktion wurde 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* (TOP10F', Invitrogen) transformiert. Die Transformation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. 50 µl Transformationsansatz wurden auf IPTG/X-Gal LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Positive Klone konnten ermittelt werden, da das PCR Produkt in den Leserahmen des Gens für das lacZ-Gen eingefügt wird. Dadurch wird dieser unterbrochen, wodurch statt blaue Kolonien, weiße Kolonien auf IPTG/ X-Gal LB-Amp-Agarplatten wachsen. Mit Hilfe der Primer M13-for und M13-rev konnten die eingefügten DNA-Fragmente sequenziert werden.

2.2.1.6. Ligation

Die Ligation des Insert mit dem linearisierten Vektor wurde mit dem Rapid DNA Ligation Kit von Roche Diagnostics (Mannheim) durchgeführt.

Bei „sticky-end“-Ligationen von DNA-Enden, die nur mit einem Enzym geschnitten wurden bzw. bei „blunt end“-Ligationen, wurde der Vektor vor der Ligation mit der Phosphatase aus Kälberdarm (CIP von NEB) eine Stunde bei 37°C dephosphoryliert. Nach der Reaktion wurde das Enzym mittels Geextraktion entfernt. Das molare Verhältnis von Vektor und Insert betrug in der Regel 1:3. Vektor und Insert wurden zunächst im Lösungspuffer gelöst, anschließend mit dem Ligationspuffer versetzt und schließlich mit der T4 DNA Ligase ligiert. Die Dauer der Ligation betrug in der Regel 30 Minuten. Die Ligation wurde nach folgendem Schema zusammenpipettiert (Tabelle 2.3).

Komponenten	Menge
Vektor	1 μ l
Insert	3 μ l
H ₂ O	0 μ l
Lösungspuffer (5x)	1 μ l
Ligationspuffer (2x)	5 μ l
T4 DNA Ligase (5U/ μ l)	0,75 μ l

Tabelle 2.3.: Zusammensetzung einer Ligationsreaktion

2.2.1.7. Transformation

Für die Transformation von Bakterien mit Plasmiden aus einer Ligation wurden ultrakompetente Bakterien zunächst mit Mercaptoethanol behandelt. 3 μ l Ligationsansatz wurde zu 50 μ l Bakterien gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 45 Sekunden Hitzeschockbehandlung (42°C) wurden die Bakterien mit 250 μ l SOC Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Jeweils 100 μ l wurde auf eine LB-Amp Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

BL21codonplus Bakterien wurden für die Proteinexpression mit etwa 100 ng des entsprechenden Expressionsvektors auf Eis nach Herstellerangaben transformiert. Jeweils 50 μ l der transformierten Bakterien wurden auf eine LB-Amp Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.8. Plasmidisolierung

Minipräparationen und Maxipräparationen wurden nach dem Protokoll der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

2.2.1.8.1. Minipräparation

Diese Methode diente der ersten analytischen Isolierung einzelner klonierter Plasmide. Sie wurde mit dem Nucleobond Plasmid Kit durchgeführt.

Für die analytische Isolierung von Plasmid-DNA wurden einzelne Klone gepickt, in 5 ml LB-Ampicillin Medium überführt und über Nacht bei 37°C angezogen. Die Plasmid-DNA wurde aus den Bakterien isoliert und in 50 μ l ddH₂O oder Elutionspuffer eluiert.

2.2.1.8.2. Maxipräparation

Bei Maxipräparationen wurde eine Vorkultur angesetzt. Dabei wurde 150 ml LB-Ampicillin Medium mit 1 ml einer Vor-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden mit dem Nucleobond PC500 Kit aufgeschlossen, die Plasmid-DNA isoliert, von bakteriellen Proteinen durch Säulenreinigung (Anionenaustauscher-Säulen) befreit und in 200 µl ddH₂O gelöst. Die Konzentrationsmessung einer 1:100 Verdünnung erfolgte am Photometer bei OD260.

2.2.1.9. Herstellung von Glycerol-Stammkulturen

Transformierte Bakterien mit dem gewünschten Plasmid wurden im Einfriermedium bei – 80°C gelagert. Hierzu wurden 12 ml einer großen Kultur (für Maxipräparation) 10 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, auf zwei Nunc Cryo TubeTM Röhren verteilt und bei – 80°C gelagert.

2.2.1.10. Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve durchgeführt. Hierfür wurden Plasmide aus Bakterien isoliert und gereinigt, um die Sequenzierungsreaktion durch Proteinbestandteile, Primer oder Ethanolreste nicht zu stören.

2.2.1.11. RNA-Isolierung und DNase-Verdau von genomischer DNA

Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurde bei der Isolierung von RNA-Molekülen gestopfte Spitzen verwendet.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus dem Zellkulturmaterial wurde das RNeasy Kit von Qiagen verwendet. Die RNA-Isolierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentrationsmessung einer 1:100 Verdünnung erfolgte im Photometer bei OD260. Die Proben wurden aliquotiert und bei – 80°C gelagert.

Die aus Zellen isolierte RNA wurde vor der Umschreibung in cDNA mit DNase behandelt, um genomische DNA-Kontamination zu beseitigen. Hierzu wurde das RQ1DNase Kit von Promega verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert (Tabelle 2.4):

Komponenten	Menge
RQ1 Dnase-Puffer	1 μ l
RNA	2 μ g
RQ1 DNase	1U/ μ g RNA
Wasser	ad 10 μ l

Tabelle 2.4.: Zusammensetzung eines DNase-Verdau

2.2.1.12. Herstellung von cDNA

Für die cDNA-Erststrang-Synthese wurde das Omniscript cDNA Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die umgeschriebenen cDNAs wurden anschließend mittels PCR mit entsprechenden Primern untersucht.

In Tabelle 2.5 ist die Zusammensetzung der cDNA-Synthese Reaktion dargestellt:

Komponenten	Menge
RT Puffer (10x)	2 μ l
dNTP Mix (5 mM pro dNTP)	2 μ l
Random Hexamer Primer (10 μ M)	2 μ l
RNase Inhibitor (10 U/ μ l)	2 μ l
RNA	2 μ g
Omniscript Reverse Transkriptase	1 μ l
Wasser	ad 20 μ l

Tabelle 2.5.: Zusammensetzung einer cDNA-Synthese Reaktion

2.2.2. Zellkultur, Mikroskopieren, exBIFC- und Funktions-Analyse

2.2.2.1. Arbeiten mit humanen Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren adhärenente Zellen. Sie wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% einer Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. HIV infizierte Zellen wurden in RPMI Medium mit 10% FCS und 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung gehalten.

Alle Zellen wurden zweimal pro Woche umgesetzt („gesplittet“). Dazu wurde altes Medium entnommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Mit einer Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen von der Zellkulturflasche bei 37°C gelöst. Die trypsinisierten Zellen wurden in Medium aufgenommen, anschließend mit frischem Medium verdünnt und weiter inkubiert. Schnell wachsende Zellen wurden zweimal pro Woche 1:20, langsam wachsende Zellen zweimal pro Woche 1:5 bis 1:10 „gesplittet“.

Zum Aussäen von Zellen für Transfektionsversuche wurden definierte Zellzahlen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen zunächst in einer Zählkammer gezählt. Es wurden drei Großquadrate gezählt, daraus der Mittelwert gebildet und mit 10^4 multipliziert. Dies ergab die Zellzahl pro ml. Folgende Zellzahlen wurden bei den entsprechenden Zelltypen ausgesät:

	HeLa	U138	HeLa-Tat-ROD	TH4-7-5	LC5-HIV
Ibidi dish/6-Loch	1×10^5	1×10^5	1×10^5	-	-
12-Loch	-	-	-	2×10^5	1×10^5

Tabelle 2.6.: Zahl der Zellen, die bei den verschiedenen Zelltypen ausgesät wurden

2.2.2.2. Fugene Transfektion

Transfektionen eukaryotischer Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz Fugene-HD nach dem Protokoll des Herstellers (Roche, Mannheim) durchgeführt.

Bei der Fugene HD Transfektion wurde zunächst die Plasmid-haltige Lösung mit Medium versetzt, welches kein FCS und kein Antibiotikum/Antimykotikum enthielt. Anschließend wurde die entsprechende Menge an Fugene HD (2,5 µl pro 1 µg Plasmid) zugegeben. Dieser Ansatz wurde gut vermischt, ca. 15 Minuten bei RT inkubiert und auf die Zellen pipettiert.

Die Inkubation erfolgte je nach Versuch für 24 – 48 Stunden bei normalen Bedingungen. Diese Methode ergab eine Transfektionseffizienz von 70 – 80 % bei HeLa-Zellen und 20 – 30 % bei Astrozyten.

2.2.2.3. Herstellung stabiler Zelllinien

Um Zelllinien stabil mit bestimmten Konstrukten zu generieren, wurden Zellen in 6-Loch-Platten mit je 500 ng der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert.

Die Zellen wurden nach der Transfektion etwa 5 bis 7 Tage in einer T75 Zellkulturflasche kultiviert, bis sie eine Konfluenz von etwa 70% zeigten. Die Plasmide enthielten ein Neomycin-Resistenzgen, wodurch die Zellen mit Geneticin (G418)-haltigem Medium (1 % G418) selektiert werden konnten.

Beide in dieser Arbeit generierten Zelllinien exprimierten entweder GFP bzw. ein GFP-Fusionsprotein. Daher war eine zusätzliche Selektion anhand der Grün-Fluoreszenz möglich. Hierfür wurden die Zellen geerntet, in PBS aufgenommen und mittels FACS Zellenpopulationen sortiert, welche hohe Grün-Fluoreszenz aufwiesen. Diese angereicherte Population wurde anschließend weiterkultiviert und polyklonale Zelllinien expandiert.

2.2.2.4. Auftauen und Einfrieren von humanen Zelllinien

In flüssigem Stickstoff oder bei -80°C gelagerte Zellen wurden bei RT aufgetaut, in vorgewärmtes Kulturmedium überführt und in Zellkulturflaschen bei normalen Bedingungen inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen in großen Zellkulturflaschen (T175) expandiert. Die Zellen wurden gewaschen, mit Hilfe von Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst (siehe 2.2.2.1) und in insgesamt 10 ml Medium aufgenommen. Nach Zellzahlbestimmung wurden etwa 5×10^6 Zellen 3 min bei 200 g abzentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in NuncCryo-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden zunächst im Kryostaten bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C dauerhaft gelagert.

2.2.2.5. Mikroskopieren am Cell Observer

Mit Hilfe des Cell Observers wurden Fluoreszenzaufnahmen von lebenden bzw. fixierten, fluoreszierenden Zellen gemacht. Die Steuerung des Mikroskops erfolgte mit der Software Axiovision 4.6.3.

Fluoreszierende Moleküle lassen sich durch Licht bestimmter Wellenlänge anregen und emittieren Licht im längerwelligeren Bereich. Tabelle 2.7 zeigt die Maxima der Absorptions- und Emissionswellenlängen der in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden Proteine. Um diese Wellenlängen zu erzeugen, wurden zugeschnittene Filter verwendet. Bei der Wahl kombinierter Fluorochrome wurde darauf geachtet, dass die Absorptions- und Emissionskurven nicht eng aneinander lagen. Dies würde zu spektralen Überlappungen führen.

Fluorochrome	Anregungs- wellenlängenmaxima	Emissions- wellenlängenmaxima
Cyan fluorescent protein (CFP)	434	477
Green fluorescent protein (GFP)	489	508
Yellow fluorescent protein (YFP)	514	527
Red fluorescent protein (DsRed)	558	583

Tabelle 2.7.: Anregungs- und Emmisionsmaxima einiger Fluoreszenzproteine

Lokalisationsbilder wurden mit einem 63-fach Immersionsobjektiv mit unterschiedlichen Belichtungszeiten und Ebenen für die einzelnen Kanäle aufgenommen. Dabei wurde auf die optimale Belichtung und Schärfe aller Kanäle geachtet.

Mit einem 40-fach Immersionsobjektiv wurden Bilder für exBIFC Analysen bei einheitlicher Ebene pro Aufnahme und einheitlicher Belichtungszeit pro Versuchsreihe aufgenommen (siehe 2.2.2.6).

2.2.2.6. exBIFC-Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Die exBIFC Methode ist eine fluoreszenzbasierte Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in eukaryotischen Zellen. Hierzu wird das erste Protein als Fusionsprotein mit CFP und der ersten Hälfte von YFP (Protein1-CFP-YFP-N) exprimiert. Das zweite Protein liegt als Fusionsprotein mit mRFP1 und der zweiten Hälfte von YFP (Protein2-mRFP1-YFP-C) in der Zelle vor. Bei Interaktion der beiden Proteine kommen die beiden YFP Hälften in räumliche Nähe und das YFP-Fluorochrom kann sich ausbilden (Wolff *et al.*, 2006b). Die Fluoreszenzintensitäten der Fluorochrome CFP und mRFP1 dienen als Transfektionskontrolle der beiden Expressionskonstrukte und wurden für die Berechnung der Interaktionsstärke verwendet.

Die entsprechende Menge an Zellen wurde in Ibidi Schälchen ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden mit beiden Konstrukten (je 300 ng) transfiziert und genau 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Schließlich wurden die Zellen ca. 20 Minuten bei 4°C inkubiert und für die mikroskopische Auswertung fixiert. Hierfür wurde das Medium von den Zellen entnommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine 2%-ige

PFA/PBS-Lösung auf die Zellen gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde das PFA entfernt und die Zellen in PBS gehalten.

Die Aufnahme der Zellen erfolgte unter Verwendung von festen Belichtungszeiten. Nachdem die CFP- und die mRFP-Fluoreszenz stärker als die YFP-Fluoreszenz war, wurden CFP- und mRFP-Bilder mit 50 ms und YFP-Aufnahmen mit 1000 ms Belichtungszeit aufgenommen. Die Bilder wurden mit dem Programm IPLab ausgewertet. Hierzu wurden einzelne Zellen per Hand umrandet und die Pixelintensitäten aller drei Fluoreszenzkanäle im gleichen Zellsegment bestimmt. Für jeden Fluoreszenzkanal wurde ein weiteres Segment gewählt, um jeweils die Intensität der Hintergrundfluoreszenz zu ermitteln.

Mittels MS Excel wurden die Daten jeder segmentierten Zelle einzeln ausgewertet. Der Hintergrundwert jedes Fluoreszenzkanals (CFP, mRFP1, YFP) einer Zelle wurde durch Multiplikation der Fläche des Zellsegments mit der mittleren Signalintensität pro Pixel des entsprechenden Hintergrundsegments berechnet. Die drei errechneten Hintergrundwerte der Zelle wurden von der gemessenen Pixelintensität des jeweiligen Fluoreszenzkanals subtrahiert. Dadurch wurden die drei Fluoreszenzsignale um den Hintergrund korrigiert. Die somit korrigierte YFP-Fluoreszenzintensität wurde durch die Summe der korrigierten Werte der CFP- und mRFP1-Fluoreszenzintensitäten geteilt. Dieser Wert (normalisiertes YFP-Signal) wurde für die Darstellung mit 100 multipliziert und mit Hilfe des Programms GraphPad Prism dargestellt. Die einzelnen Schritte der Interaktionsberechnung sind in Tabelle 2.8 dargestellt

	mittlere Signalintensität pro Pixel (M)	Fläche (F)	$F * M(\text{Hintergrund}) = B$	gemessene Fluoreszenzintensität (I)	$I - B = I''$	$\frac{I''(\text{YFP})}{(I''(\text{CFP})+I''(\text{mRFP1}))} = Y$	$Y * 100$
CFP	120,10	18567	1924283,88	2,23E+06	3,06E+05	0,02730	2,730
CFP Hintergrund	103,64	2592		268632			
mRFP1	3899,58	18567	5960564,01	7,24E+07	6,64E+07		
mRFP Hintergrund	321,03	2592		832121			
YFP	254,19	18567	2897566,02	4,72E+06	1,82E+06		
YFP Hintergrund	156,06	2592		404507			

Tabelle 2.8.: Auswertung von exBIFC Analysen

Die Berechnung der Interaktionsstärke erfolgt nach folgendem Schema: Die mittlere Signalintensität pro Pixel (M) des Hintergrundsegments jedes Farbkanals (CFP, mRFP1 und YFP) wird mit der Fläche der Zelle multipliziert (Werte rot markiert). Dieser Wert (B) wird von der gemessenen Fluoreszenzintensität (I) des entsprechenden Fluoreszenzkanals abgezogen (I-B), wodurch die Fluoreszenzintensität um den Hintergrund korrigiert wird (I''). Die Interaktionsstärke wird durch die Division des korrigierten Wertes der YFP-Fluoreszenz durch die Summe der korrigierten Werte für die CFP- und mRFP1-Fluoreszenz berechnet (Y). Dieser Wert wird für die Darstellung mit 100 multipliziert.

2.2.2.7. Funktionsanalysen

2.2.2.7.1. Rev-Reporter-System

Die Funktionsanalyse wurde mit dem in (Wolff *et al.*, 2006a) beschriebenen Rev-Reporter-System durchgeführt. Dieses System basiert auf dem Vektor pLRed(2xINS)R, welcher die DNA-Kodierungssequenz für *DsRed1* unter der Transkriptionskontrolle der HIV-LTR kodiert. Nach diesem Gen folgen ein Translations-Stopcodon, zwei p17/p24 INS-Sequenzen und eine RRE-Sequenz. Die p17/p24 Instabilitäts-Elemente (INS) destabilisieren die Reporter-mRNA und verursachen den Abbau der mRNA im Zellkern. An die RRE-Sequenz der RNA kann Rev binden, die mRNA stabilisieren und den Transport in das Zytoplasma vermitteln. Die Expression des *DsRed1*-Reporterproteins in diesem System ist Tat und Rev abhängig. Mit dieser Methode ist eine stufenlose Bestimmung der Tat- bzw. Rev-Funktion zwischen 0% und 100% möglich.

Die Funktionsanalysen wurden in HeLa-Zellen und in Astrozyten durchgeführt.

Durchführung in HeLa-Zellen:

Es wurden stets mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Die HeLa-Zelllinie HeLa-Tat-ROD, welche stabil Konstrukte für Tat und das Reporter-Gen (pLRed(2xINS)R) enthält, wurde für Funktionsanalysen in HeLa-Zellen verwendet. In diese Zellen wurde das Expressionsplasmid für Rev-GFP transfiziert und die Reporterprotein-Produktion nach 48 Stunden im FACS beobachtet. Hierfür wurden 1×10^5 Zellen in 6-well-Platten mit 200 ng RevGFP-Plasmid transfiziert, 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und schließlich für die FACS-Analyse geerntet (siehe unten).

Bei der Untersuchung des Einflusses von anderen Proteinen auf die Reporterprotein-Produktion wurden 200 ng des entsprechenden Expressionsplasmids co-transfiziert.

Durchführung in Astrozyten (U138)

Für die Experimente in U138 Astrozyten gab es keine stabile Reporter Zelllinie. Daher wurden mindestens drei unabhängige Experimente transient durchgeführt.

1×10^5 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte wurden mit 1,5 µg pLRed(2xINS)R, 400 ng pCTat und 300 ng RevGFP-Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet und im FACS analysiert (siehe unten).

Bei Astrozyten wurden 300 ng Expressionsplasmid für Proteine, deren Einfluss auf die Reporterprotein-Produktion getestet wurde, co-transfiziert.

Auswertung der Funktionsanalysen mit dem FACS

Mit dem FACS wurden transfizierte Zellen auf die Reporterprotein-Produktion untersucht. Zunächst wurden die Zellen anhand ihrer Größe und Granularität ausgewählt. Dazu wurden Vorwärts-Streulicht (FCS) und Seitwärts-Streulicht (SSC) ermittelt. Durch dieses Ausschlussverfahren wurde für eine möglichst homogene und gesunde Zellpopulation gesorgt.

Die transfizierten Zellen mussten vor der FACS-Analyse geerntet werden. Hierzu wurden die Zellen in 6-Loch-Platten zuerst mit PBS gewaschen, dann trypsiniert und anschließend in Medium aufgenommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und schließlich in PBS aufgenommen.

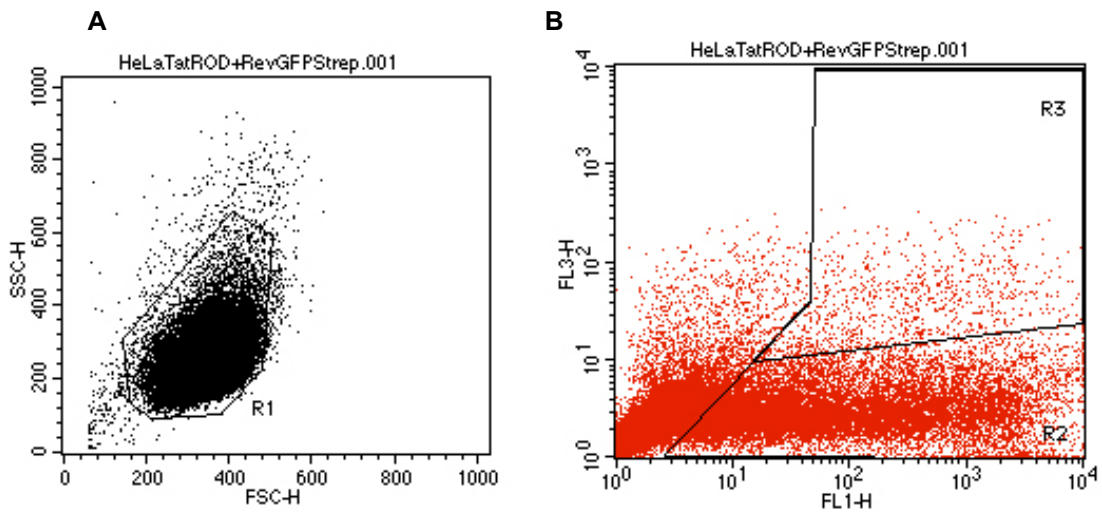
Mit Hilfe der Negativ- (ohne Rev) und Positivkontrolle (Rev-GFP) wurde das Gerät derart geeicht, dass im roten Kanal nur sehr wenig Signal (ca. 1%) vorhanden war. Zudem wurde die Sensitivität so eingestellt (Kompensation), dass verschieden stark fluoreszierende Zellen gleichzeitig detektiert werden konnten.

Die erstellten Plots wurden mit dem Programm Cell Quest oder FlowJo ausgewertet. Die grüne Fluoreszenz wurde nach Transfektion von allen Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, exprimiert. Die Grün-Fluoreszenz ist somit eine Kontrolle für die Transfektion. Es wurde die Zahl der Zellen ermittelt, die innerhalb der grünfluoreszierenden Zellpopulation auch rote Fluoreszenz zeigten, da diese das funktionelle Rev enthalten. Die Daten eines typischen Experiments, ermittelt durch die Software Cell Quest, ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Im ersten Dot Plot sind gegeneinander Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht aufgetragen. Die homogene Zellpopulation wurde durch das erste „Gate“ (R1) markiert (Abb 2.1 (A)). In einem weiteren Dot Plot wurden die zwei Fluoreszenzen in der Population R1 gemessen und gegeneinander aufgetragen. Die grüne Fluoreszenz entspricht FL-1 und die rote Fluoreszenz FL-3. Die Population von Zellen, die nahezu alle transfizierten Zellen umschließt, wurde mit „R2“ markiert. Rot- und grün-fluoreszierende Zellen wurden mit „R3“ markiert (Abb. 2.1 (B)).

Abbildung 2.1. (nächste Seite): Auswertung der FACS-Daten

(A) Vorwärts- und Seitwärts- Streulicht sind in diesem Dot Plot gegeneinander aufgetragen. Das erste „Gate“ (R1) definiert eine homogene Zellpopulation. **(B)** Im zweiten Dot Plot wurden die zwei Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen. Die grüne Fluoreszenz entspricht FL-1 und die rote Fluoreszenz FL-3. In diesem Dot Plot wurden nur die Zellen ausgewertet, die in (A) mit „R1“ selektiert wurden. Die Population von Zellen, die nahezu alle transfizierten Zellen umschließt, wurde mit „R2“ markiert. Rot- und grünfluoreszierende Zellen wurden dagegen mit „R3“ markiert.



Die Daten wurden mit dem Programm Microsoft Excel ausgewertet.

Für jedes Einzelexperiment wurde der Quotient aus G3 (Rot- und Grünfluoreszierende Zellen) durch G2 (grünfluoreszierende Zellen) gebildet. Die Positivkontrolle jeder Experimentreihe wurde auf 100% gesetzt und die anderen Werte (Rev-GFP-Mutanten oder Rev-GFP co-transfiziert mit anderen Proteinen) der gleichen Experimentreihe darauf bezogen. Der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten und die entsprechende Standardabweichung wurden mit dem Programm GraphPad Prism in einem Balkendiagramm dargestellt.

2.2.2.7.2. Nachweis von intra- und extrazellulärem p24 mittels ELISA

Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschrieben, in einer 12-Loch-Platte ausgesät und transfiziert bzw. mit siRNAs behandelt (siehe 2.2.3.11). Nach 24 Stunden wurde das Medium entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit genau 1 ml frischem Medium versetzt. Die Zellen wurden anschließend weitere 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Intra- und extrazelluläre Proben wurden für den p24 ELISA und Zelllysate für den Western Blot entnommen. Der Überstand wurde 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. 450 µl Überstand wurden mit 50 µl einer 5 %-igen TritonX-100-Lösung versetzt, 10 Minuten bei RT inkubiert und bei – 20°C zwischengelagert (extrazelluläre p24 Probe). Die adhärenen Zellen wurden mit 100 µl 5%-TritonX-100-Lösung pro Loch 15 Minuten lysiert. 50 µl Lysat wurde für Western Blot Analysen entnommen, 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert

und bei -20°C eingefroren (Western Blot Probe). Die restlichen 50 μl Zelllysat wurden mit 450 μl PBS auf 0,5 % TritonX-100 verdünnt, 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und bei -20°C eingefroren (intrazelluläre p24 Probe).

Die intra- und extrazellulären p24 Proben wurden für den ELISA verdünnt. Proben von TH4-7-5 Zellen wurden 1:200 und von LC5-HIV Zellen 1:10000 in einem Endvolumen von 200 μl verdünnt. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe einer gereinigten p24-Lösung, deren Konzentration bekannt war.

Die verdünnten Proben wurden auf eine mit α -p24-Antikörper beschichteten 96-Loch Platte gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte 4-mal mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurde ein Biotin-gekoppelter α -HIV-1-Antikörper dazugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen (4-mal) wurde die Platte 30 Minuten mit einer Streptavidin-HRPO Lösung inkubiert. Es folgten erneut 4 Waschschrte und die Reaktion wurde mit einer Substratlösung gestartet. Im Dunklen wurde 20 – 30 Minuten bis zu einem Farbumschlag inkubiert und schließlich die Reaktion mit einer Schwefelsäure-Lösung gestoppt. Im Mikroplatten-Leser wurde bei 450 nm (Referenz 570 nm) gemessen.

Die Auswertung erfolgte mittels MS Excel. Eine Standardlinie wurde aus den bekannten Konzentrationen der Verdünnungsreihe der Standardprobe (gereinigte p24-Lösung) und den im ELISA gemessenen Werte gebildet. Aus der mathematischen Funktion der Standardlinie wurden die Konzentrationen der gemessenen extra- bzw. intrazellulären p24-Proben ermittelt und der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit dem Programm GraphPad Prism dargestellt.

2.2.3. Proteinchemische Methoden

2.2.3.1. Zellaufschluss von eukaryotischen Zellen

Zur Gewinnung von Zelllysaten für die *Strep*TagII-Affinitätschromatographie wurden pro Reinigung etwa 8×10^7 Zellen von insgesamt 10 Zellkulturflaschen (T175) gelöst, mit 10 ml Lysispuffer (siehe 2.1.1) versetzt und unter ständiger Rotation eine Stunde bei 4°C inkubiert. Um Zellkerne aufzuschließen, wurden die Zellen 10-mal durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,55 mm (24 G) gezogen. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Schließlich wurde das Lysat

mit Hilfe eines Filters mit 5 µm Porengröße filtriert, um DNA- und Zell-Fragmente zu entfernen.

Für die Immunpräzipitationen wurden die Zellen direkt in der Zellkulturflasche lysiert. Pro Ansatz wurden 2 Zellkulturflaschen (T175) mit insgesamt etwa $1,5 \times 10^7$ Zellen eine Stunde mit 2 ml Lysispuffer (siehe 2.1.1) bei 4°C inkubiert. Mit einem Zellkulturschaber wurden die Zellen von dem Boden der Zellkulturflasche entfernt, mehrfach durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,55 mm (24 G) gezogen und 10 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert.

2.2.3.2. Co-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde sowohl mit U138 als auch mit HeLa-Zelllysaten nach dem in Abbildung 2.2 abgebildeten Schema durchgeführt. Für beide Zelltypen lagen stabile Zelllinien vor, die RevGFP (U138-RevGFP-*Strep*TagII und HeLa-pHitRevGFP α -Klon) bzw. GFP (U138-GFP-*Strep*TagII und HeLa-GFP) exprimierten. Die GFP-exprimierenden Zellen wurden als Kontrolle für unspezifische Interaktionen von zellulären Proteinen mit dem Antikörper, dem ProteinG bzw. dem *Strep*TagII in der U138-Zelllinie verwendet.

Die Zellen wurden, wie in 2.2.3.1 beschrieben, lysiert. Um unspezifisch mit Protein-G bindende Proteine aus dem Zelllysate zu entfernen, wurde das Zelllysate (2 ml) mit 60 µl Protein-G-haltige Lösung versetzt, das Gemisch eine Stunde bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert und anschließend eine Minute bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 8 µg Antikörper-Lösung (polyklonaler Kaninchen- α -GFP-Antikörper) pro Reaktion versetzt und eine Stunde bei 4°C rotierend inkubiert. Zum Antigen-Antikörper-Komplex wurden 60 µl einer Protein-G-haltige Lösung gegeben und über Nacht bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Anschließend wurde der Antigen-Antikörper-ProteinG-Komplex eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, welches den Antigen-Antikörper-ProteinG-Komplex enthielt, mit 500 µl Phosphor-Puffer (ohne Proteaseinhibitoren) versetzt. Der Komplex wurde erneut eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde 5-mal wiederholt. Schließlich wurde das Pellet mit SDS-Auftragspuffer versetzt, bei 5 Minuten 95°C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

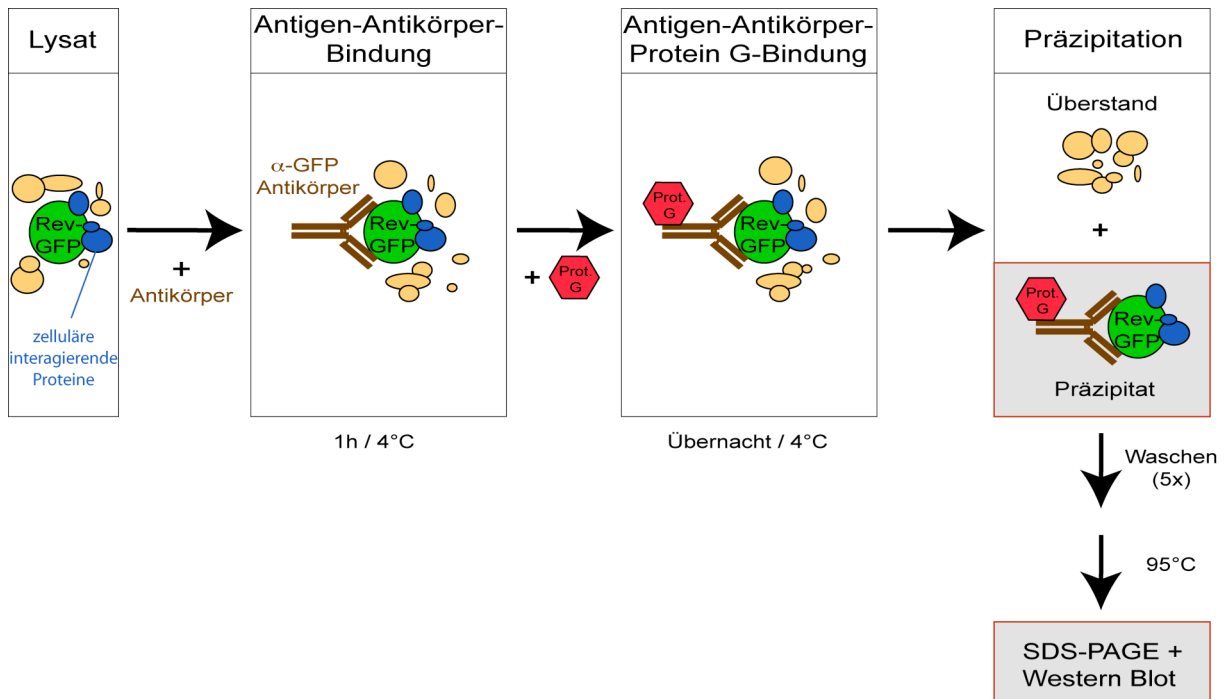


Abbildung 2.2.: Co-Immunpräzipitation

Das überexprimierte Protein (z.B. RevGFP) wird mit Hilfe eines Antikörpers aus dem Lysat gebunden. Der Komplex aus dem Antigen und dem Antikörper wird mittels Protein-G an Sepharose gebunden und durch Zentrifugation von restlichen Proteinen getrennt. Nach mehreren Waschstritten wird das Präzipitat durch Aufkochen in die einzelnen Bestandteile getrennt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.3.3. Rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli*

Zur Anzucht wurden 4 Liter LB-Amp-Medium in 4 Erlenmeyerkolben mit insgesamt 80 ml einer Übernachtskultur (BL21-codonplus transformiert mit dem entsprechenden Plasmid für die Expression des rekombinanten Proteins) angeimpft.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von etwa 0,5 bei 550 nm. Anschließend wurde die Bakterienkultur bei 34°C inkubiert. Die Kultur wurde mit 145 rpm geschüttelt und ihr Wachstum durch stündliche Probenentnahme zur Messung der optischen Dichte verfolgt.

Bei einer optischen Dichte von $OD_{550} = 0,6 - 0,8$ (GFP-exprimierende Bakterien: 0,6 / RevGFP-exprimierende Bakterien: 0,8) wurde mit 1 mM IPTG im Endvolumen induziert. Dies führt zur Expression der T7-Polymerase, welche im Genom der Bakterien kodiert und unter der Kontrolle des *lacZ*-Promotors steht.

Bei einer $OD_{550} = 0,8 - 1$ (GFP-exprimierende Bakterien: 0,8 / RevGFP-exprimierende Bakterien: 1) wurde die Kultur mit 100 μ l Anhydrotetracyclin in DMF (2 mg/ml) pro 1000 ml Kultur induziert. Anhydrotetracyclin bindet an das allosterische Zentrum des *tet*-Repressors und verursacht dessen Freisetzung vom *tet*-Promotor/Operator infolge einer Konformationsänderung. Dadurch wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch die T7-Polymerase eingeleitet. Die anschließende Induktionsdauer betrug 2 bis 3 Stunden bis eine OD_{550} von ca. 1,3 – 1,5 erreicht wurde. Die Zellen wurden dann wie in 2.2.3.4 beschrieben geerntet und aufgeschlossen.

2.2.3.4. Zellaufschluss von prokaryotischen Zellen

Die Bakterienkultur wurde zunächst 15 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und anschließend auf Eis in jeweils 10 ml Lysispuffer pro 1000 ml Kultur resuspendiert. Der Lysispuffer enthielt Lysozym (siehe 2.1.1), welches die Zellwand der Bakterien abbaut. Die Zellen wurden hierfür 30 Minuten bei 37°C inkubiert, da Lysozym bei 37°C die größte Effizienz besitzt. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung weiter aufgeschlossen. Die Zellen wurden etwa 15-mal 15 Sekunden unter leichtem Schwenken einer Ultraschall-Schwingsonde ausgesetzt. Dies erfolgte auf Eis, um eine lokale Erwärmung zu unterbinden. Schließlich wurde das Lysat zuerst 30 Minuten bei 6000 rpm und dann 20 Minuten bei 16000 rpm zentrifugiert. Das Protein-Lysat wurde mit Hilfe eines Filters (5 μ m Porengröße) von restlichen Zell- und DNA-Bestandteilen befreit.

2.2.3.5. StrepTagII-Affinitätschromatographie mit rekombinanten Proteinen und humanen Zelllysaten

Die bakteriellen Lysate mit rekombinantem RevGFP-*Strep*TagII (4 Liter Anzucht) bzw. rekombinantem GFP-*Strep*TagII (2 Liter Anzucht) wurden zunächst 15 Minuten bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde auf je eine äquilibrierte *Strep*Tactin-Sepharose-Säule (5 ml Säulenvolumen) gegeben. Nach Durchlauf der Lösung wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Durch Einsetzen eines Waschpuffers mit 500 mM NaCl sollte eine effizientere Reinigung des rekombinanten Proteins von bakteriellen Proteinen erreicht werden. Anschließend wurde auf jede Säule das Zelllysate von etwa 8×10^7 Zellen (Zellaufschluss siehe 2.2.3.1) gegeben. Nach

Durchlauf des Lysates wurde die Säule mit 7 Säulenvolumen Waschpuffer (250 mM NaCl) gewaschen. An dieser Stelle wurde 250 mM statt 150 mM NaCl (Angabe des Herstellers) eingesetzt, um unspezifische Interaktionen zwischen Rev und zellulären Proteinen zu reduzieren. Die Elution erfolgte unter Verwendung des Waschpuffers, versetzt mit hohem Salzgehalt (1,5 M NaCl). Es wurden 15 Fraktionen à 1,5 ml eluiert. Der Proteingehalt jeder Fraktion wurde mittels Bradford Methode (siehe Abschnitt 2.2.3.9) analysiert.

Schließlich wurden alle Fraktionen vereinigt und mit 22,5 ml Waschpuffer (250 mM NaCl) versetzt, um die Salzkonzentration im Eluat zu verringern. Die ca. 45 ml Elutionslösung wurde mit Hilfe einer 15 ml Amicon-Aufkonzentrationssäule auf 600 µl Endvolumen aufkonzentriert und mit 200 µl SDS-Auftragspuffer (4-fach) versetzt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 95°C wurde die Probe bei – 20°C gelagert. Für jedes Experiment wurde eine frische Säule verwendet, um das Vorhandensein von Rest-Proteinen an der Säule aus alten Reinigungen auszuschließen.

2.2.3.6. SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE Analysen wurden 4-12%-ige SDS-Polyacrylamidgele (Bis-Tris) und das MES-Puffersystem der Firma Invitrogen verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurden pro Tasche jeweils 15 µl Proteinlösung mit 5 µl SDS-Auftragspuffer (4-fach) versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 14000rpm zentrifugiert. In die Probentaschen wurden je 15 µl Proteinlösung und in eine Tasche 10 µl Proteinstandard pipettiert. Leere Taschen wurden mit 1-fachem Auftragspuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde unter Verwendung des MES-Laufpuffers bei etwa 120 V durchgeführt. Nach ca. 2 Stunden hatte der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreicht und das Gel wurde für die Western-Blot-Analyse oder Colloidal Coomassie Färbung verwendet.

2.2.3.7. Colloidal Coomassie Färbung

Die Colloidal Coomassie Färbung erfolgte mit dem Kit der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurde das Gel zunächst fixiert und anschließend 10 Minuten in Lösung A inkubiert. Schließlich wurde Lösung B dazugegeben und etwa 3 Stunden unter ständigem Schwenken weiter inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte über Nacht durch Inkubation mit ddH₂O.

2.2.3.8. Western Blot-Analyse

Für den Elektrotransfer wurden 2 Blatt Filterpapiere mit Transferpuffer getränkt und ohne Einschluss von Luftblasen auf die Edelstahl-Anodenplatte der Elektroblo-Apparatur gelegt. Darauf wurde zuerst die mit Transferpuffer benetzte Nitrozellulose-Membran, dann das Gel (in Transferpuffer inkubiert) und schließlich zwei weitere Filterpapiere platziert. Nach Aufsetzen der Kathodenplatte wurde für 45 Minuten eine konstante Spannung von 15 V angelegt. Die Membran wurde anschließend mit Ponceau-Lösung inkubiert, um die Transfereffizienz zu ermitteln. Nach Entfärben der Membran mit ddH₂O wurde diese über Nacht in einer Lösung aus 20 ml PBS-T und 10 ml Milch bei 4°C geblockt.

Anschließend wurde die geblockte Membran 30 Minuten mehrfach mit PBS-T gewaschen. Die Membran wurde mit dem entsprechenden Erstantikörper in PBS-T/Milch-Lösung (2:1) zwei Stunden bei RT inkubiert und dann erneut 30 Minuten mehrfach mit PBS-T gewaschen. Der Erstantikörper wurde indirekt über einen zweiten, mit „Meerrettich Peroxidase“ konjugierten Antikörper (Detektionsantikörper), nachgewiesen. Der Zweitantikörper ist speziensspezifisch und ist gegen die Fc-Domäne des ersten Antikörpers gerichtet. Der Detektionsantikörper wurde in PBS-T/Milch-Lösung (2:1) zu der Membran gegeben und eine Stunde bei RT inkubiert. Schließlich wurde die Membran erneut mehrfach mit PBS-T für 30 Minuten gewaschen. Durch Zugabe des Substrats wurde der Zweitantikörper durch Chemielumineszenz nachgewiesen. Die Membran wurde 7 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Folien in eine Filmkassette gelegt. Im Dunkelraum wurden Filme in unterschiedlichen Zeitabständen auf die Membran aufgelegt und gebundene Sekundärantikörper durch Schwärzung des Films detektiert.

2.2.3.9. Bestimmung der optischen Dichte einer Proteinlösung mittels der Bradford Methode

5 µl einer Proteinlösung wurde in ein Loch einer 96-Loch Platte pipettiert und mit 250 µl Bradford Reagenz (vorgewärmt auf Raumtemperatur) versetzt. Nach einer Inkubation von etwa 2 Minuten bei RT wurde die optische Dichte der Lösung bei 595 nm im Microplate Reader gemessen.

2.2.3.10. MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde in Kollaboration mit dem Institut für Humangenetik (Dr. Stefanie Hauck, Dr. Marius Ueffing, GSF) durchgeführt.

Hierfür wurden Proteinbanden im SDS-Polyacrylamid-Gel mittels Colloidal Coomassie angefärbt (2.2.3.8) und anschließend einzelne Banden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten.

Der Trypsinverdau mit einer 0,01 µg/µl Trypsin-Lösung diente der Isolierung der Proteine aus dem Gel. Die Peptide wurden anschließend im Massenspektrometer analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Mascot. Alle Aufgaben ab dem Trypsinverdau wurden vom Kollaborationspartner wie publiziert durchgeführt (Hauck *et al.*, 2005).

2.2.3.11. RNA Interferenz mittels synthetischer siRNAs

Die RNAi Untersuchungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt. Die Angaben sind nach der Anleitung des Herstellers (Qiagen).

Die Zellen wurden entsprechend der Tabelle 2.6 in 12-Loch Platten ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 2 µg siRNAs wurde mit Medium (ohne Serum und Antibiotika) in einem Endvolumen von 100 µl versetzt und gevortext. Anschließend wurde 12 µl RNAiFect-Transfektionsreagenz hinzugegeben, gevortext und 15 Minuten bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde das alte Medium von den ausgesäten Zellen abgenommen und 600 µl frisches Medium (mit Serum und Antibiotika) auf die Zellen gegeben. Die siRNA-Medium-RNAiFect-Mischung wurde anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Reaktionsmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium (mit Serum und Antibiotika) versetzt. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen geerntet und analysiert.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Aufreinigung von zellulären Rev-interagierenden Faktoren aus humanen Astrozyten mit Hilfe der *StrepTactin/StrepTagII*-Affinitätschromatographie Methode. Hierfür wurde das RevGFP-Protein C-Terminal mit dem *StrepTagII* versehen. Als Kontrolle für unspezifische Interaktionen mit dem GFP, dem *StrepTagII* und dem Säulenmaterial diente das GFP-*StrepTagII*-Protein.

Die Identifizierung von isolierten Rev-interagierenden Faktoren erfolgte mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Western Blot Analyse. Die Verifikation der spezifischen Interaktion der Faktoren mit dem Rev-Protein wurde mittels Co-Immunpräzipitation und exBIFC-Analyse durchgeführt. Zudem wurde die Interaktion der Faktoren mit dem Rev-Protein in HeLa-Zellen analysiert.

Schließlich wurde der Einfluss neuer Rev-interagierender Faktoren auf die Produktion des Reporterproteins im Rev-abhängigen Reportersystem (Wolff *et al.*, 2003) und auf die HIV-1 Replikation untersucht.

3.1. Der *StrepTagII* hat keinen Einfluss auf die Lokalisation und Funktion von RevGFP in humanen Zellen

Zunächst wurde der Einfluss des *StrepTagII* auf die Lokalisation und Funktion von RevGFP in humanen Zellen untersucht, um zu zeigen, dass das *StrepTagII* die Eigenschaften des Rev-Proteins nicht verändert. Hierbei wurde das Lokalisationsverhalten bzw. die Funktionalität von RevGFP-*StrepTagII* mit RevGFP verglichen.

Für die Untersuchung der Lokalisation von RevGFP-*StrepTagII* wurden RevGFP bzw. RevGFP-*StrepTagII* transient in HeLa-Zellen und Astrozyten exprimiert. Anschließend wurde die Lokalisation beider Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert und quantifiziert. RevGFP-*StrepTagII* zeigte in HeLa-Zellen eine nukleäre und nukleoläre Lokalisation und in U138MG-Astrozytom Zellen eine weitgehend zytoplasmatische Lokalisation. Demnach besitzt RevGFP-*StrepTagII* das gleiche Lokalisationsverhalten wie RevGFP ohne das *StrepTagII* (Abbildung 3.1).

Somit hat der *StrepTagII* keinen Einfluss auf die „steady state“ Lokalisation des RevGFP-Proteins.

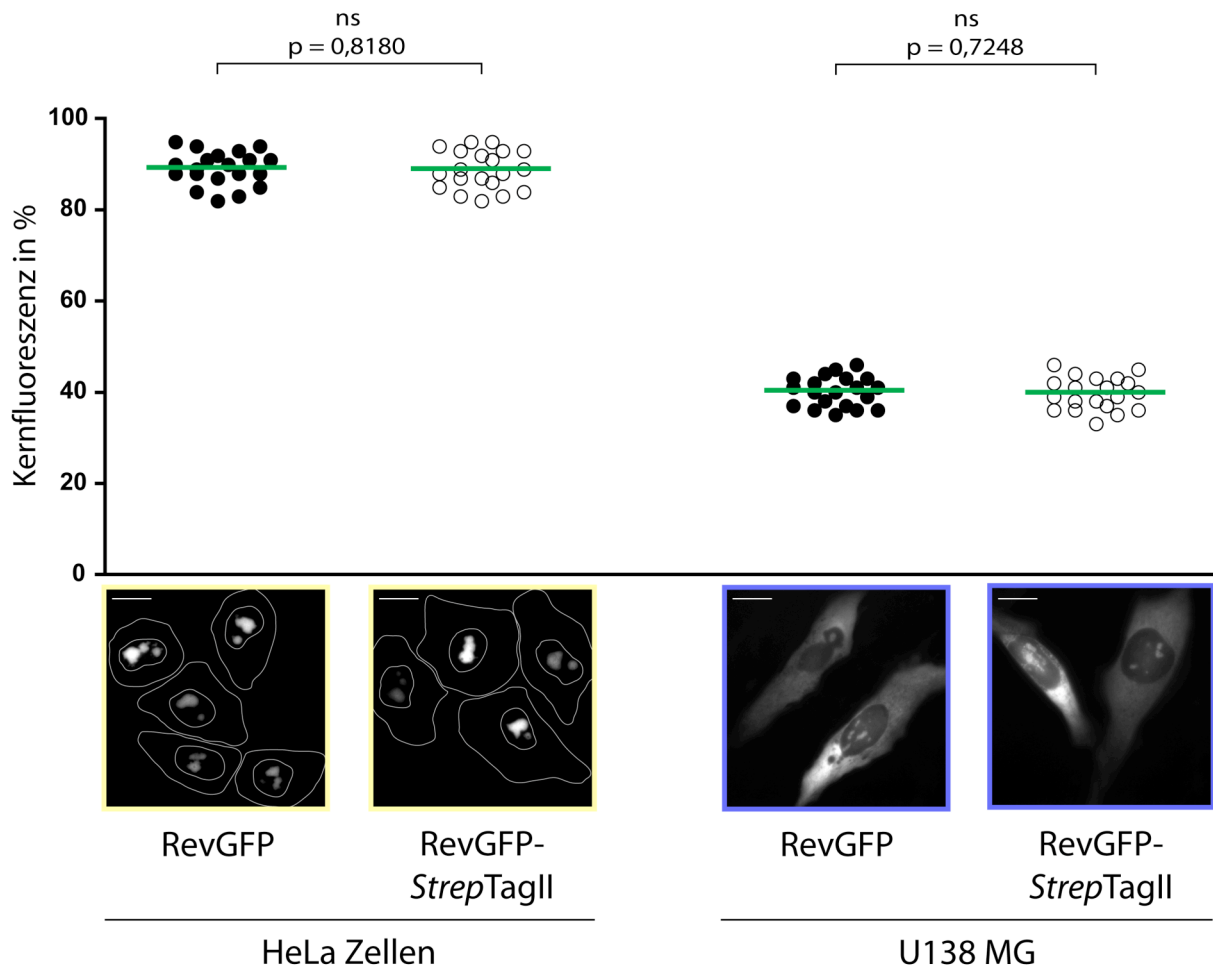


Abbildung 3.1.: Einfluss des *StrepTagII* auf die Lokalisation von RevGFP

Die Lokalisation von RevGFP und RevGFP-*StrepTagII* in HeLa-Zellen und U138MG-Astrozytom Zellen (jeweils 20 Zellen) wurde quantitativ ausgewertet. Das RevGFP-*StrepTagII* besitzt sowohl in HeLa-Zellen als auch in Astrozyten die gleiche Lokalisation wie RevGFP. Es sind repräsentative Zellen dargestellt, welche die Lokalisation von RevGFP und RevGFP-*StrepTagII* in den beiden Zelllinien zeigen. In HeLa-Zellen sind Kern- und Zellumrisse angedeutet.

Maßstab: 20 μm

Die Aktivierungsfunktion von RevGFP und RevGFP-*StrepTagII* wurde mit einem Rev-Reportersystem bestimmt (Wolff *et al.*, 2003), in dem die Produktion des Reporters *DsRed1* durch das Rev-Protein aktiviert wird (siehe Abschnitt 2.2.2.7.1).

In Abbildung 3.2 sind die Daten von jeweils drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die RevGFP Aktivierungsfunktion in HeLa-Zellen wurde auf 100 % gesetzt und alle weiteren Funktionsversuche darauf bezogen. RevGFP-*StrepTagII*

hatte sowohl in HeLa-Zellen als auch in Astrozyten die gleiche Fähigkeit die Produktion des Reporterproteins zu steigern, wie RevGFP ohne das *StrepTagII*.

Eine Fusion mit dem *StrepTagII* hat demnach keinen Einfluss auf die Funktion des Rev-Proteins.

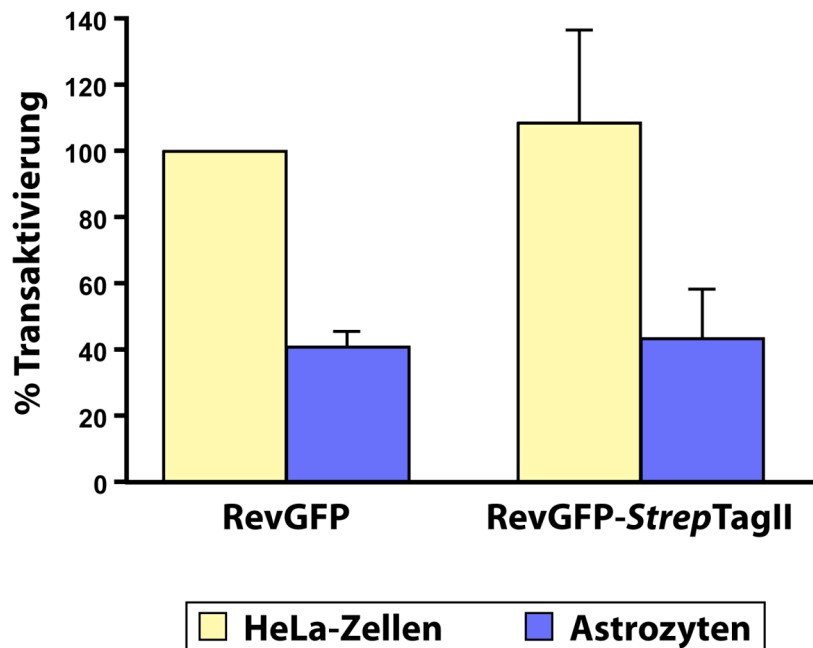


Abbildung 3.2.: Einfluss des *StrepTagII* auf die Aktivierungsfunktion von RevGFP

Die Funktion von RevGFP-*StrepTagII*, bestimmt mit dem Rev-Reportersystem (Wolff *et al.*, 2003), ist vergleichbar mit der Aktivierungsfunktion von RevGFP in HeLa-Zellen und Astrozyten. Dargestellt sind die Werte aus drei unabhängigen Experimenten. Die RevGFP Funktion in HeLa-Zellen wurde auf 100 % gesetzt und alle weiteren Daten darauf bezogen.

3.2. Generierung von zwei stabil RevGFP-*StrepTagII* bzw. GFP-*StrepTagII* exprimierenden Astrozytomzelllinien (U138MG)

Die Bestätigung der Interaktionen von neuen Rev-interagierenden Faktoren mit Rev wurde mittels Co-Immunpräzipitation durchgeführt (siehe 3.3.2). Hierfür wurde eine stabile U138MG-Zelllinie generiert, welche RevGFP-*StrepTagII* konstitutiv exprimiert. Als Kontrollzelllinie diente eine U138-GFP-*StrepTagII* Zelllinie. Mittels dieser Kontrolle konnten unspezifische Interaktionen von zellulären Proteinen mit dem GFP,

dem *StrepTagII* und dem Sepharose-Protein-G detektiert werden. Beide Zelllinien exprimieren das gewünschte Protein unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

In der U138-RevGFP-*StrepTagII* Zelllinie zeigten zunächst wenige Zellen eine Grün-Fluoreszenz. Um eine Population anzureichern, die einheitlich RevGFP-*StrepTagII* exprimierte, wurde mittels durchflusszytometrischer Sortierung von der Ausgangszelllinie eine Population mit stärkerer Grün-Fluoreszenz ausgewählt. Diese RevGFP-*StrepTagII* exprimierende Population wurde expandiert und ein zweites Mal sortiert. Hierdurch wurde eine Zelllinie generiert, in der etwa 90 % der Zellen RevGFP-*StrepTagII* exprimierten. Diese Beobachtung wurde mittels FACS Analyse quantifiziert (Abbildung 3.3/A).

Von den stark grün-fluoreszierenden U138-GFP-*StrepTagII* Zellen wurden die Zellen sortiert, die geringere Mengen an GFP-*StrepTagII* exprimierten. Dadurch sollte erreicht werden, dass die Expressionsstärken der beiden Zelllinien nicht zu stark voneinander abweichen. Die quantitative Analyse mittels FACS zeigte, dass ebenfalls etwa 90 % der U138-GFP-*StrepTagII* Zelllinie eine Grün-Fluoreszenz besaß (Abbildung 3.3/B).

In Abbildung 3.3 sind Fluoreszenzaufnahmen beider Zellen dargestellt.

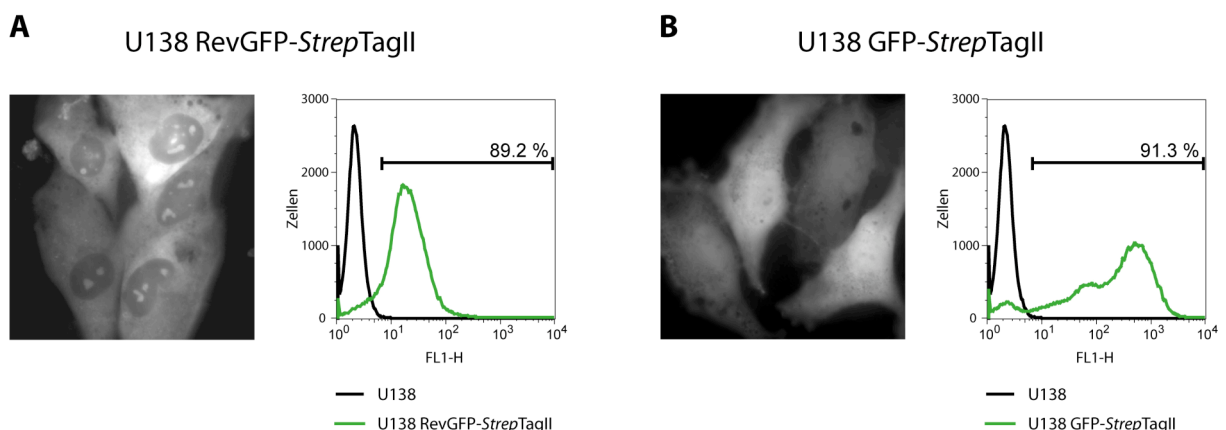


Abbildung 3.3.: Fluoreszenzaufnahmen von stabilen U138MG-Zelllinien

Fluoreszenzaufnahmen der (A) U138-RevGFP-*StrepTagII* und (B) der U138-GFP-*StrepTagII* Zelllinie zeigen eine typische, im Vergleich zu HeLa-Zellen verstärkt zytoplasmatische Lokalisation von RevGFP-*StrepTagII* und eine homogene Verteilung von GFP-*StrepTagII* in der gesamten Zelle. Die Analyse der Zellen mittels FACS zeigte, dass jeweils ca. 90 % der Zellen RevGFP-*StrepTagII* bzw. GFP-*StrepTagII* exprimieren.

FL1-H: Grün-Fluoreszenz

3.3. Interaktionsstudien mit bakteriell hergestelltem Rev-Protein

3.3.1. Isolierung von zellulären Rev-interagierenden Proteinen aus Astrozytenzelllysaten mit Hilfe von bakteriell hergestelltes RevGFP-*StrepTagII*

Die Isolierung von Rev-interagierenden Faktoren aus humanen Zelllysaten erfolgte mit Hilfe von gebundenem, bakteriell hergestelltem RevGFP-*StrepTagII*. Die Vor- und Nachteile dieses Affinitätschromatographie-Ansatzes sind in Abschnitt 4.1 diskutiert. Als Kontrolle für unspezifische Interaktionen von zellulären Proteinen mit dem GFP-Protein, dem *StrepTagII* bzw. der *StrepTactin*-Säule wurde bakteriell hergestelltes GFP-*StrepTagII* verwendet.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die Expressionskassetten von sRevGFP und GFP über *Bsal* Schnittstellen vor den *StrepTagII* in den Vektor pASK-IBA3plus kloniert und die jeweiligen Proteine in *E. coli* produziert.

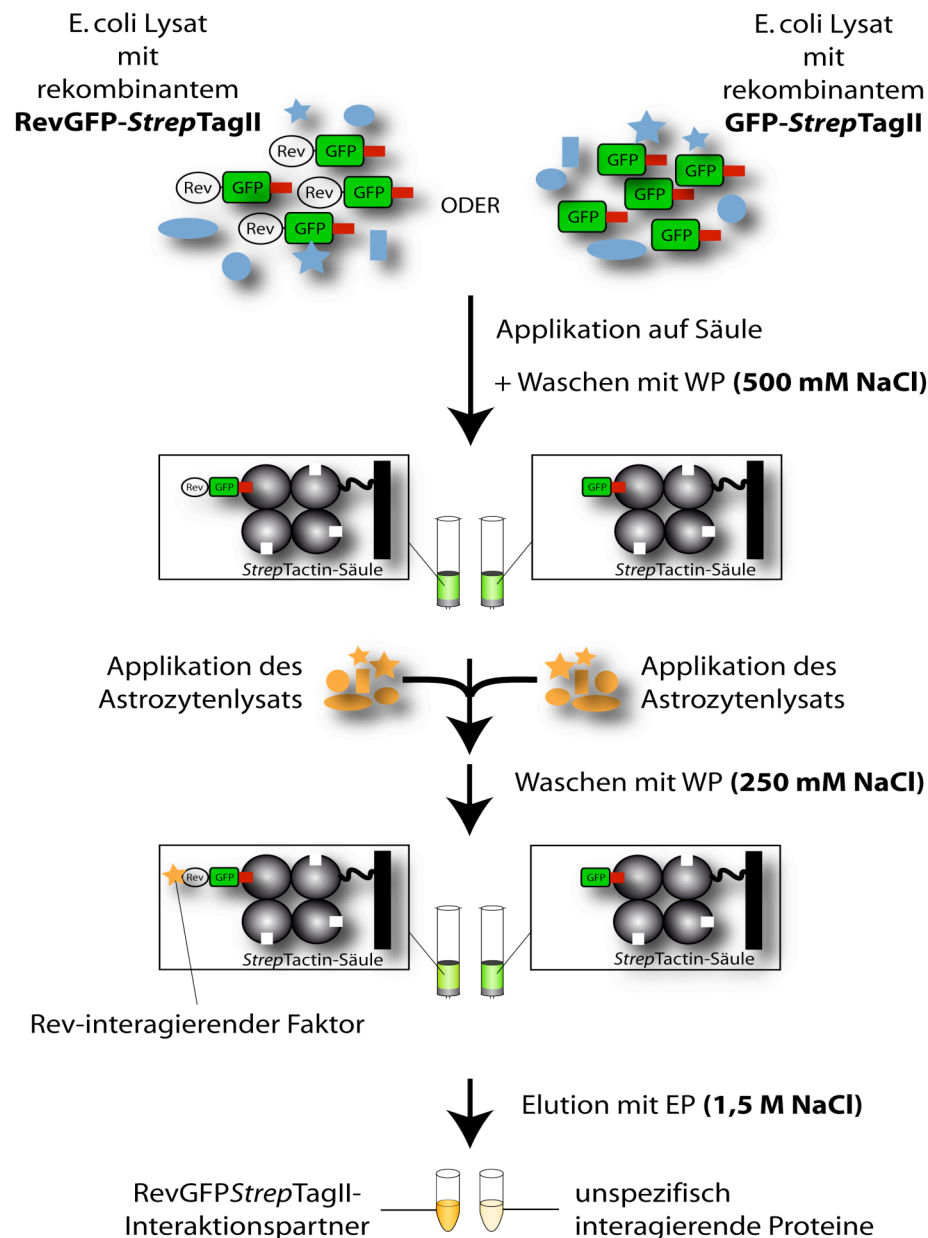
Die Prozedur für die Isolierung von Rev-interagierenden Faktoren mittels bakteriell hergestelltem RevGFP-*StrepTagII* erfolgte nach dem Schema in Abbildung 3.4.

Bakterielles Gesamtzelllysate mit rekombinantem Protein (z.B. RevGFP-*StrepTagII*) wurde auf die Sepharose *StrepTactin*-Säule geladen und anschließend bakterielle Proteine durch mehrere Waschstufen (Waschpuffer mit 500 mM NaCl) entfernt. Nach Applikation von humanen Zelllysaten, wurde die Säule erneut gewaschen (Waschpuffer mit 250 mM NaCl), um nicht an RevGFP-*StrepTagII* gebundene Proteine zu entfernen. Im Anschluss wurden gebundene zelluläre Proteine mit einem Hochsalzpuffer (Waschpuffer mit 1,5 M NaCl) eluiert, aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analysen untersucht.

Als Kontrolle für unspezifische Interaktionen wurden bei jedem Experiment humane Zelllysate einer Chromatographie mit *StrepTactin*-gebundenem, bakteriell hergestelltem GFP-*StrepTagII* unterzogen (Abbildung 3.4).

Abbildung 3.4. (nächste Seite): Schematischer Ablauf einer Reinigung mit rekombinanten Proteinen

Bakterielle Lysate mit rekombinanten Proteinen wurden zunächst auf die Säule appliziert und nicht gebundene bakterielle Proteine anschließend durch Waschen mit einem Waschpuffer (WP) mit hoher Salzkonzentration (500 mM NaCl) entfernt. Anschließend wurde die Säule mit humanen Zelllysaten beladen und nicht gebundene Proteine durch erneutes Waschen (Puffer: 250 mM NaCl) entfernt. Die Elution gebundener zellulärer Proteine erfolgt durch die Verwendung eines Hochsalz-Puffers (1,5 M NaCl) (EP). Die Elutionsfraktionen wurden aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.



Die Affinitätschromatographie mit RevGFP-*StrepTagII* zur Gewinnung von Rev-interagierenden Proteinen aus Astrozyten wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Hierbei wurde zum einen Zelllysate von 85HG66-Astrozytom Zellen und zum anderen von U138MG-Astrozytom Zellen verwendet.

Die Elutionsfraktionen aus den RevGFP-*StrepTagII* bzw. GFP-*StrepTagII* Reinigungen mit Astrozytenzelllysaten (U138MG und 85HG66) wurden zunächst im SDS-Gel analysiert. In Abbildung 3.5/A sind die Elutionsfraktionen der U138MG Affinitätschromatographien mit RevGFP-*StrepTagII* (RGS) bzw. GFP-*StrepTagII* (GS)

exemplarisch dargestellt. Auf das SDS-Gel wurde dreimal mehr Volumen an GFP-*Strep*TagII Eluat (Kontrolle) als RevGFP-*Strep*TagII Eluat aufgetragen.

Dabei waren mehrere Banden nur in den RevGFP-*Strep*TagII Elutionsfraktionen sichtbar. Diese wurden aus jeder Reinigung (85HG66 und U138MG) ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Etwa die Hälfte der identifizierten Proteinbanden waren bakterielle Proteine, die für weitere Analysen nicht von Interesse waren. Ein weiterer Teil der identifizierten Proteinbanden (etwa ein viertel der untersuchten Banden) waren humane ribosomale Proteine. Diese Proteine werden häufig bei Interaktionsuntersuchungen mittels Affinitätschromatographie isoliert (Roy *et al.*, 2006). Daher wurden diese Proteine ebenfalls nicht weiter untersucht.

Drei der analysierten Proteinbanden wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie als Poly-A binding protein 1 (PABP1), Nucleosome assembly protein 1 like 1 (NAP1L1) und Histon H2A identifiziert. Die entsprechenden Banden sind in Abbildung 3.5/A rot markiert. Zwei weitere Proteinbanden, die untersucht wurden, waren Proteine, die als Rev-interagierende Proteine publiziert sind. Diese waren B23 und Casein Kinase 2 (CK2) und sind in Abbildung 3.5/A blau markiert.

In Tabelle 3.1 sind die Identifikationswerte der Datenbankrecherche („protein score“ in Mascot) für die neuen Rev-interagierenden Proteine und die Anzahl der jeweils analysierten Peptide dargestellt. Diese Wert (100, 143 und 80) sagen aus, dass nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-100} , 10^{-143} bzw. 10^{-80} die jeweilige Identifikation zufällig war. Ein Wert von 60 ist hierbei als Schwellenwert definiert. Identifikationswerte über 60 sind signifikant ($p < 0,05$).

Protein	Identifikationswert der Datenbankrecherche („protein score“ in Mascot)	Anzahl analysierter Peptide
PABP1	100	21
NAP1L1	143	3
Histon H2A	80	4

Tabelle 3.1.: Daten der Massenspektroskopieuntersuchungen

In dieser Tabelle sind die Identifikationswerte aus der Datenbank („protein score“ in Mascot) für die jeweils analysierten Proteinbanden dargestellt. Bei Identifikationswerten über 60 kann davon ausgegangen werden, dass eine signifikante Identifizierung erfolgte ($p < 0,05$). Weiterhin sind Angaben zu der jeweils untersuchten Peptidanzahl aufgeführt.

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Elutionsfraktionen zeigte einen „Peak“ bei den Reinigungen mit RevGFP-*Strep*TagII (RGS+85HG66 und RGS+U138), nicht aber mit GFP-*Strep*TagII Elutionsfraktionen (Abbildung 3.5/B).

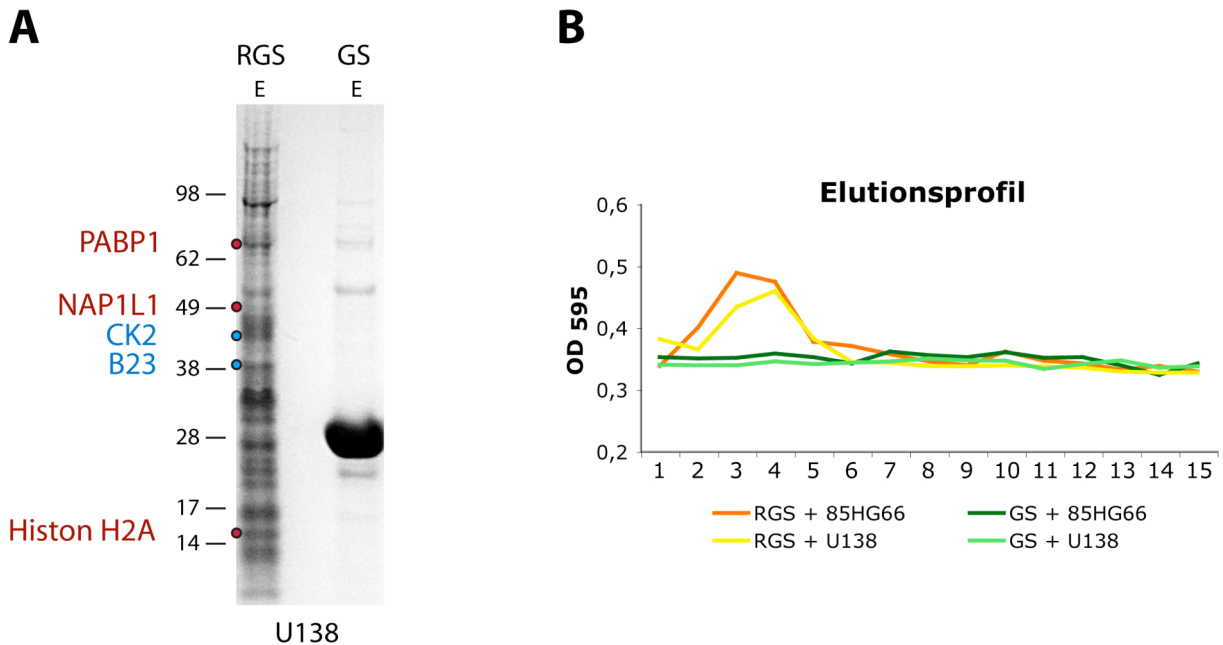


Abbildung 3.5.: Isolierung von Rev-interagierenden Faktoren aus Astrozytenzelllysaten

(A) Dargestellt sind die Elutionsfraktionen (E) der Reinigungen mit RevGFP-*Strep*TagII (RGS) und GFP-*Strep*TagII (GS) im Colloidal Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Exemplarisch ist die Reinigung mit U138MG Astrozytomzelllysate dargestellt, um zu zeigen, wie die Verteilung der eluierten Proteinbanden in den Reinigungen war. Aufgetragen wurde 3-mal soviel Volumen an GFP-*Strep*TagII Eluat als RevGFP-*Strep*TagII Eluat. Es ist zu sehen, dass viele Proteinbanden ausschließlich in der RevGFP-*Strep*TagII Elutionsfraktion vorkommen. Mehrere Proteine wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Fünf dieser Banden konnten mittels MALDI-TOF MS als Poly-A binding protein 1 (PABP1), Nucleosome assembly protein 1 like 1 (NAP1L1), Casein Kinase 2 (CK2), B23 und Histon H2A identifiziert werden. Bei den Proteinen CK2 und B23 handelt es sich um bereits publizierte Rev-interagierende Proteine. (B) Die Elutionsprofile der Reinigungen mit RevGFP-*Strep*TagII bzw. GFP-*Strep*TagII und den Zelllysaten von 85HG66- bzw. U138MG-Astrozytom Zellen wurden mittels Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford untersucht. Nur in den Elutionsfraktionen der RevGFP-*Strep*TagII Reinigungen sind Peaks für eluierte Proteine detektierbar.

Die Elutionsfraktionen von beiden Reinigungen wurden anschließend auf bekannte und neue Rev-interagierende Faktoren in Western Blot Analysen untersucht.

In Abbildung 3.6/A ist zu sehen, dass mit Lysaten aus beiden Astrozyten-Zelllinien (85HG66 und U138MG) fünf publizierte Rev-interagierenden Proteine: B23, Casein

Kinase 2 (CK2), CRM1, eIF-5A und Importin- β (siehe Abschnitt 10.2, Tabelle 10.1) in den Elutionsfraktionen der RevGFP-*Strep*TagII Reinigung detektierbar waren. In den Elutionsfraktionen der GFP-*Strep*TagII Reinigungen waren diese jedoch nicht nachweisbar. Dies zeigt, dass es mit dieser Methode möglich ist, spezifisch verschiedene Rev-interagierende Faktoren aus Zelllysaten zu isolieren. Außerdem konnte erstmals gezeigt werden, dass B23, CK2, CRM1, eIF-5A und Importin- β in Astrozytenzelllysaten mit dem Rev-Protein interagieren können.

Weiterhin wurden die Eluate auf die Anwesenheit von Proteinen untersucht, die in noch unpublizierten Vorarbeiten aus der Gruppe als mögliche Rev-Interaktoren in Astrozytenzelllysaten identifiziert wurden. Dazu zählten die Proteine Nucleolin, hnRNP-Q und hnRNP-A1, welche mit einem Peptid, das die ersten 14 Aminosäuren des Rev-Proteins enthält, interagierten (Mäusbacher, 2006). Die Proteine PABP1, NAP1L1 und Histon H2A konnten in dieser Arbeit mittels MALDI-TOF MS als Rev-interagierende Proteine identifiziert werden. Das Protein PARP1 konnte in Immunpräzipitationen mit einem Risp-enthaltenden Protein co-präzipitiert werden (Michelle Vincendeau, unveröffentlichte Daten). Nachdem die Risp-Domäne mit dem Rev-Protein interagiert (siehe Abschnitt 10.2, Tabelle 10.1), wurde in dieser Arbeit analysiert, ob auch PARP1 mit dem Rev-Protein interagiert.

Alle analysierten Proteine traten wesentlich stärker in den Elutionsfraktionen der RevGFP-*Strep*TagII-Reinigungen (RGS), als in den Elutionsfraktionen der GFP-*Strep*TagII-Reinigungen (GS) auf (Abbildung 3.6/B). Lediglich im Falle von Nucleolin und Histon H2A war jeweils eine schwächere Bande in den GFP-*Strep*TagII Elutionsfraktionen detektierbar. Dies zeigte eine geringfügige, unspezifische Interaktion dieser Proteine mit dem GFP-*Strep*TagII oder der Säule.

In den Elutionsfraktionen von den RevGFP-*Strep*TagII-Säule konnten weder GAPDH noch RNA Polymerase II nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht, dass nicht alle Proteine aus den Zelllysaten an das Rev-Protein binden (Abbildung 3.6/C).

Die Western Blot Ergebnisse zeigen somit, dass die Proteine Nucleolin, hnRNP-Q, hnRNP-A1, PARP1, PABP1, NAP1L1 und Histon H2A aus 85HG66- und U138MG-Astrozytomzelllysaten mit HIV-1 Rev interagieren.

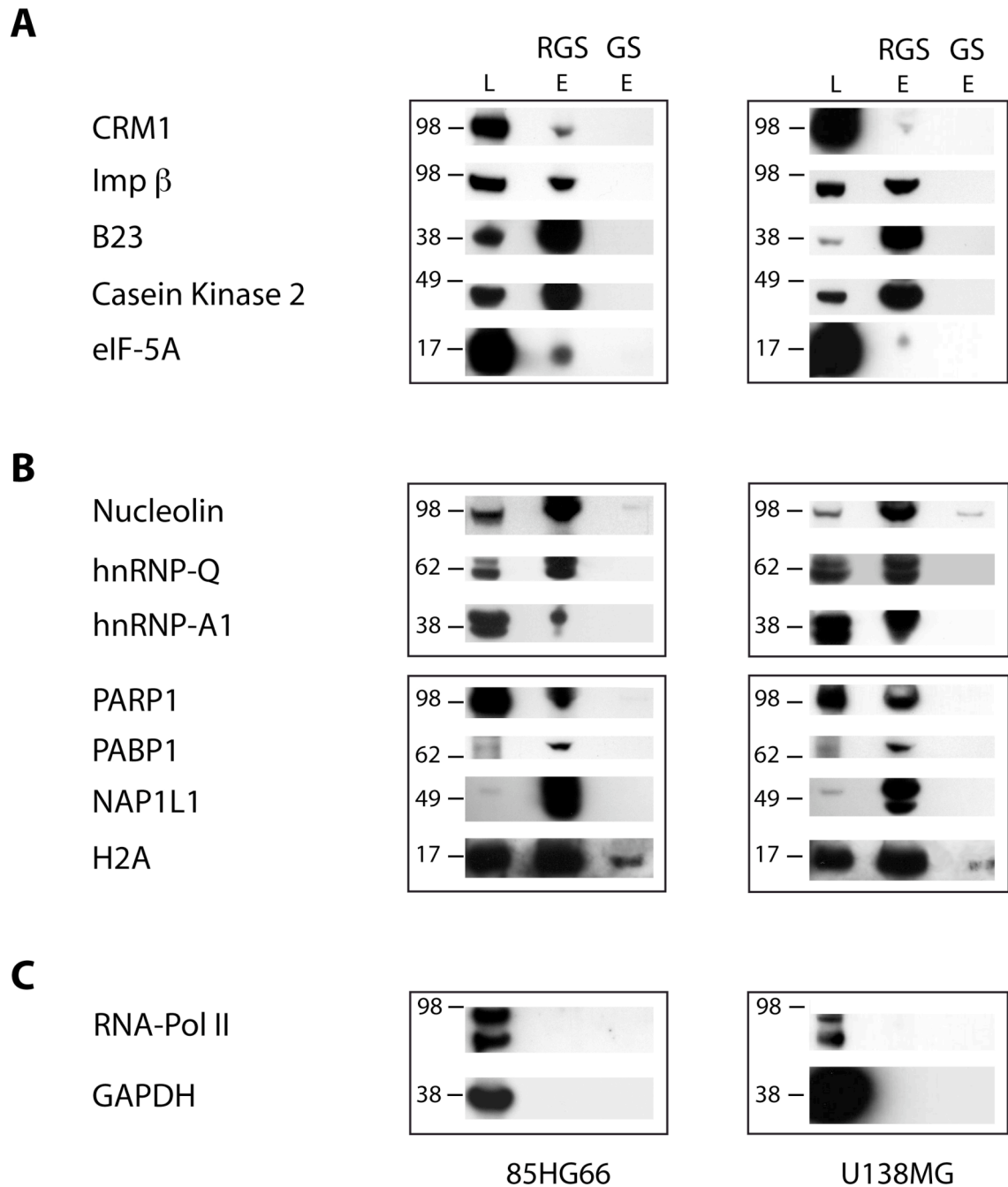


Abbildung 3.6.: Untersuchung der Elutionsfraktionen auf publizierte und neue Rev-Interaktionspartner

(A) Die Elutionsfraktionen (E) der beiden Reinigungen (85HG66 und U138MG) wurden auf publizierte Rev-interagierende Proteine untersucht. Die Proteine B23, Casein Kinase 2, CRM1, eIF-5A und Importin- β konnten in den Lysaten (L) und in den RevGFP-*Strep*TagII (RGS) Elutionsfraktionen mit jeweils einem spezifischen Antikörper detektiert werden. In den GFP-*Strep*TagII (GS) Elutionsfraktionen waren diese Proteine nicht nachweisbar. **(B)** Die Proteine Nucleolin, hnRNP-Q, hnRNP-A1, PARP1, PABP1, NAP1L1 und Histon H2A konnten nur in den Elutionsfraktionen (E) der RevGFP-*Strep*TagII (RGS) Reinigung nachgewiesen werden und interagieren somit mit HIV-1 Rev. Die Proteine Nucleolin und Histon H2A zeigten jedoch eine geringfügig unspezifische Interaktion mit dem GFP-*Strep*TagII (GS) oder der Säule. **(C)** Als Negativkontrollen dienten die Proteine GAPDH und RNA Polymerase II. GAPDH und RNA-Polymerase II waren nur in den Lysaten, aber in keinem der Elutionsfraktionen zu sehen. Somit konnte gezeigt werden, dass nicht alle zellulären Proteine an Rev binden konnten

3.3.2. Verifikation der Interaktion von Rev mit mehreren Rev-interagierenden Proteinen durch Co-Immunpräzipitation

Mittels Co-Immunpräzipitation sollte die Interaktion des Rev-Proteins mit den neu identifizierten Rev-interagierenden Faktoren, welche durch *StrepTagII*-Affinitätschromatographie isoliert wurden, bestätigt werden. Hierfür wurden die Zelllinien U138-RevGFP-*StrepTagII* und U138-GFP-*StrepTagII* verwendet (siehe 3.2).

Die Co-Immunpräzipitation wurde wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Abbildung 3.7 zeigt exemplarisch die Western Blot Ergebnisse einer Co-Immunpräzipitation.

Alle untersuchten Proteine waren in den Zelllysaten der U138-RevGFP-*StrepTagII* und der U138-GFP-*StrepTagII* Zelllinie detektierbar. Dies zeigt, dass alle Proteine in beiden Zelllinien exprimiert wurden.

Die Proteine PABP1, hnRNP-Q und hnRNP-A1 konnten in den RevGFP-*StrepTagII* Präzipitate, aber nicht im GFP-*StrepTagII* Präzipitate detektiert werden. Dieses Ergebnis verifiziert die spezifische Interaktion von Rev mit PABP1, hnRNP-Q, und hnRNP-A1. Die Interaktion von Rev mit PABP1 war jedoch nur sehr schwach sichtbar und wurde deshalb in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Die Interaktion von Rev mit NAP1L1 bzw. Histon H2A konnte nicht mittels Co-Immunpräzipitation untersucht werden, da die Antikörper gegen diese Proteine für die Western Blot Analysen und der verwendete α GFP-Präzipitationsantikörper aus der gleichen Spezies stammten. Dies führte bei den durchgeführten Western Blot Analysen zu Kreuzreaktionen. Eine spezifische Interaktion von Nucleolin bzw. PARP1 mit Rev war in Co-Immunpräzipitationsanalysen nicht sichtbar (Abbildung 3.7). Nachdem eine Bestätigung der Interaktion dieser Proteine mit Rev nicht möglich war, wurden keine weiteren Untersuchungen mit diesen Proteinen durchgeführt.

Mit einem α GFP Antikörper aus der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Proteine RevGFP-*StrepTagII* und GFP-*StrepTagII* präzipitiert wurden. Als Positivkontrolle wurde die Co-Präzipitation des bereits publizierten Rev-Interaktionspartners eIF-5A mit Rev untersucht. Dieses Protein war stärker im RevGFP-*StrepTagII* Präzipitat als im GFP-*StrepTagII* Präzipitat detektierbar und zeigte somit eine Interaktion mit Rev.

Die Untersuchung von GAPDH diente als Negativkontrolle, um zu zeigen, dass durch die Waschschrirte keine ungebundenen Proteine in den Präzipitaten vorlagen. In keinem der beiden Präzipitate war dieses Protein nachweisbar.

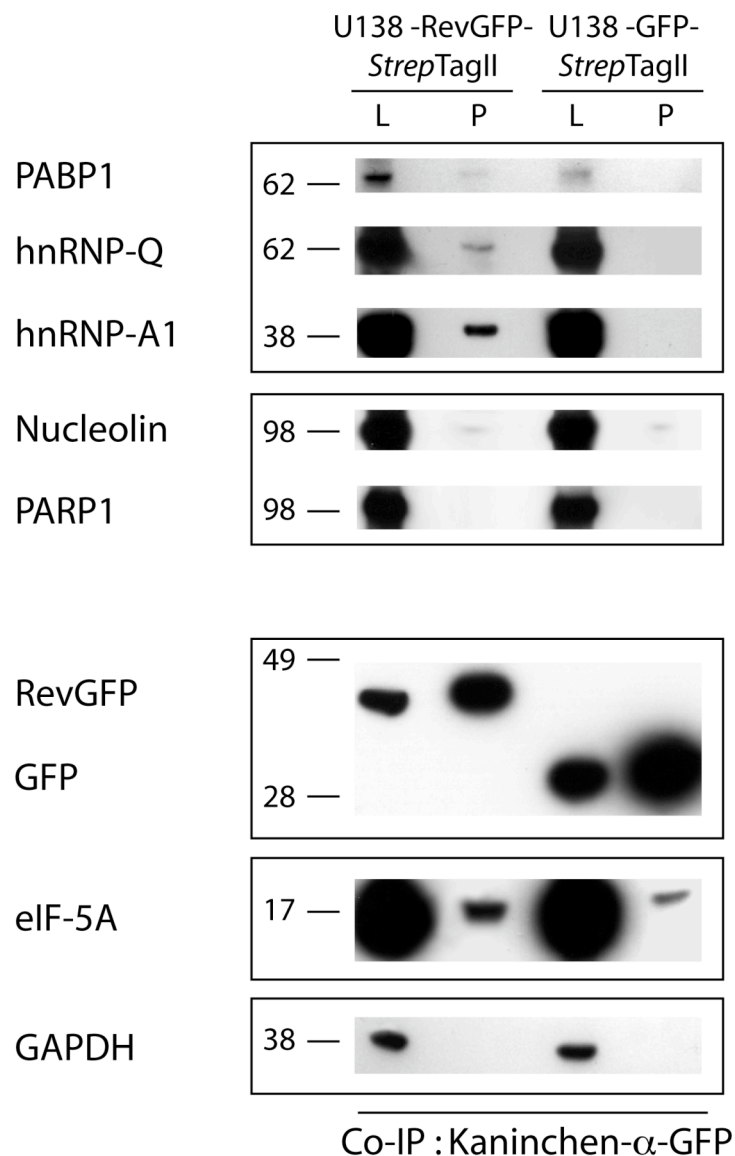


Abbildung 3.7.: Immunpräzipitation zur Verifikation der Interaktion von Rev mit isolierten Rev-interagierenden Faktoren

Die Immunpräzipitation von GFP-gekoppelten Proteinen mit einem Kaninchen- α GFP-Antikörper wurde mit den Zelllinien U138-RevGFP-*StrepTagII* und U138-GFP-*StrepTagII* durchgeführt.

Die Proteine hnRNP-Q, hnRNP-A1 und PABP1 konnten nur im RevGFP-*StrepTagII* Präzipitat, jedoch nicht im GFP-*StrepTagII* Präzipitat detektiert werden. Eine Co-Präzipitation von Nucleolin bzw. PARP1 mit RevGFP-*StrepTagII* war nicht nachweisbar.

Mit einem Ratte- α GFP-Antikörper konnte im Western Blot die effiziente Präzipitation von RevGFP-*StrepTagII* bzw. GFP-*StrepTagII* detektiert werden. Mit einem spezifischen Antikörper gegen eIF-5A, ein bekannter Rev-interagierender Faktor, konnte im RevGFP-*StrepTagII* Präzipitat (P) eine intensivere Bande als im GFP-*StrepTagII* Präzipitat nachgewiesen werden. Dies zeigte die Co-Präzipitation von eIF-5A mit Rev. Das Protein GAPDH war in keinem der beiden Präzipitate sichtbar.

3.3.3. Untersuchung der Interaktion von Rev mit hnRNP-A1 und hnRNP-Q mittels exBIFC Methode in HeLa-Zellen

Die Proteine hnRNP-A1 und Q waren die einzigen Proteine, die sowohl in den Affinitätschromatographien, als auch in Immunpräzipitationen mit dem Rev-Protein interagierten. Daher wurde die Bindung dieser beiden Proteine an das Rev-Protein zusätzlich mit einer dritten, zellbasierenden Methode (exBIFC) in HeLa-Zellen untersucht. Die Durchführung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben.

Bei diesen Untersuchungen wurden jeweils zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Proteine hnRNP-A1 und hnRNP-Q wurden jeweils an CFP-YFP-N gekoppelt und in HeLa-Zellen, zusammen mit Rev-mRFP1-YFP-C bzw. mRFP1-YFP-C überexprimiert.

Wie in Abbildung 3.8/A dargestellt, konnte mittels exBIFC keine Interaktion von Rev mit hnRNP-A1 in HeLa-Zellen gezeigt werden. Hier war kein signifikanter Unterschied in der normalisierten YFP-Signalstärke zwischen der Interaktion von hnRNP-A1-CFP-YFP-N mit Rev-mRFP1-YFP-C und der Kontrolle (hnRNP-A1-CFP-YFP-N mit mRFP1-YFP-C) zu sehen. Die exBIFC-Untersuchungen von hnRNP-Q-CFP-YFP-N mit Rev-mRFP1-YFP-C in HeLa-Zellen zeigten, dass Rev an hnRNP-Q (Signifikanz: $p = 0,0001$) bindet. Es waren Unterschiede in der normalisierten YFP-Signalstärke im Vergleich zu den Kontrollen zu sehen. Repräsentative Zellen, welche die jeweiligen Konstrukte exprimierten, sind in Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 3.8/A dargestellt.

Als Positivkontrolle für diese Untersuchungen wurde die Rev-Rev-Interaktion analysiert (Wolff *et al.*, 2006b). In Abbildung 3.8/B ist zu sehen, dass die Interaktion von Rev-CFP-YFP-N mit Rev-mRFP1-YFP-C mittels exBIFC-Analyse mit einer hohen Signifikanz ($p = 0,0001$) nachweisbar war. Das ermittelte und normalisierte YFP-Signal der Rev-Rev-Interaktion war im Vergleich zu den Kontrollen (Rev-CFP-YFP-N mit mRFP1-YFP-C bzw. Rev-mRFP1-YFP-C mit CFP-YFP-N) etwa doppelt so stark.

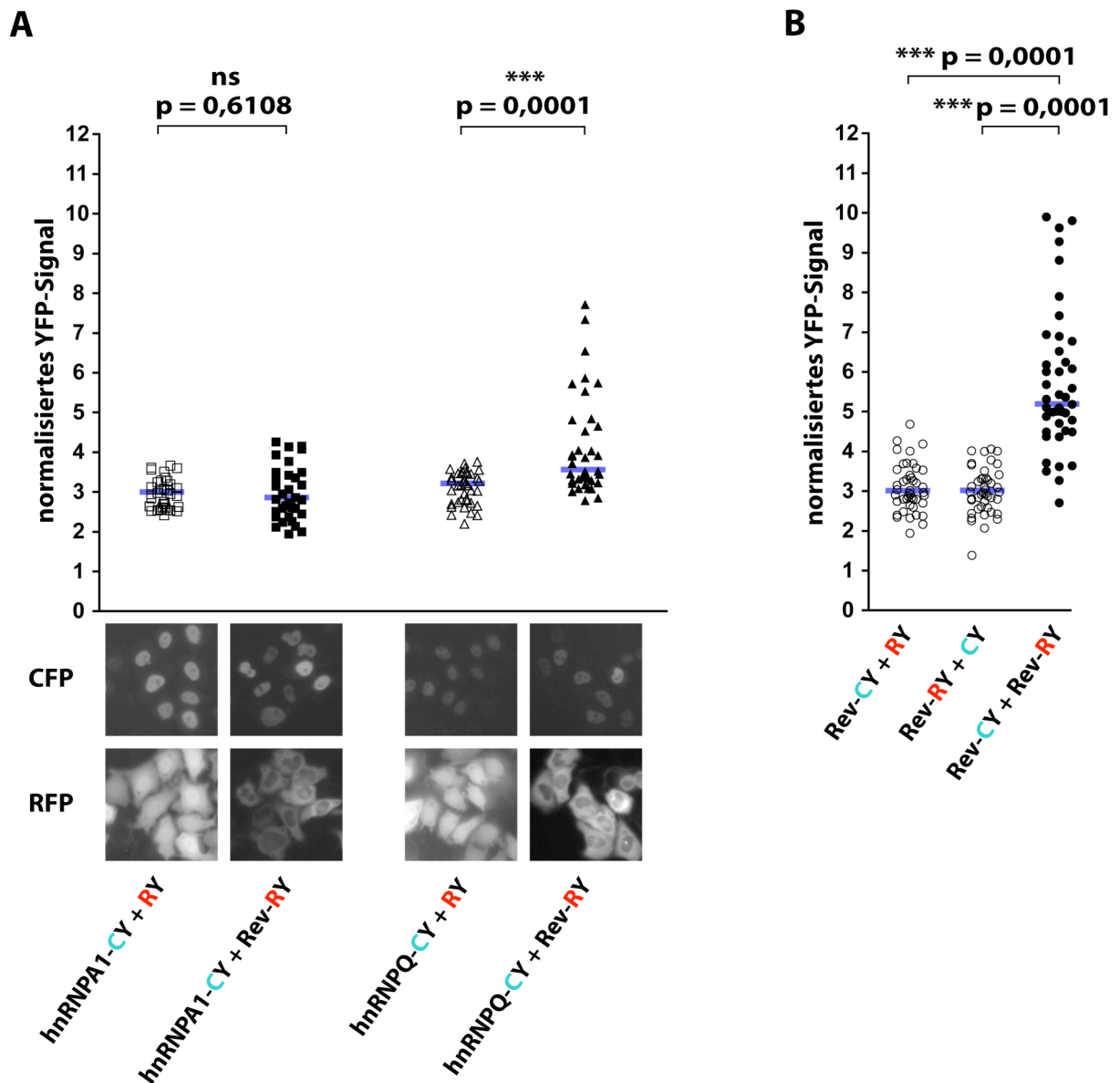


Abbildung 3.8.: Untersuchung der Interaktion von Rev mit hnRNP-A1 und hnRNP-Q mittels exBIFC Methode in HeLa-Zellen

Je zwei unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Einzelne Punkte repräsentieren einzelne, ausgewertete Zellen. Die horizontale Linie zeigt die Medianwerte jeder Analyse.

(A) Eine Interaktion von hnRNP-A1-CFP-YFP-N mit Rev-mRFP1-YFP-C konnte in HeLa-Zellen nicht gezeigt werden. Hier war ein ähnliches YFP-Signal wie bei der Co-Expression mit der Kontrolle zu sehen. HnRNP-Q zeigte mit dieser Methode eine Interaktion mit Rev in HeLa-Zellen. Es ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt der Fluoreszenzaufnahme dargestellt.

(B) Die Interaktion der Positivkontrolle (Rev-Rev-Interaktion) konnte mit der exBIFC Methode in HeLa-Zellen gezeigt werden. Die Co-Expression von Rev-CFP-YFP-N mit Rev-mRFP1-YFP-C führte zur Entstehung eines stärkeren YFP-Signals als bei der Co-Expression mit den jeweiligen Kontrollen (mRFP1-YFP-C bzw. CFP-YFP-N).

(Test: Mann-Whitney t-test)

3.3.4. Untersuchung der zelltypabhängigen Interaktion von Rev mit hnRNP-A1 und hnRNP-Q

Eine Interaktion von hnRNP-A1 mit Rev in HeLa-Zellen konnte in exBIFC Analysen nicht gezeigt werden, in Astrozyten war jedoch eine Bindung zu sehen (Affinitätschromatographien und Co-Immunpräzipitationen). Daher war die Untersuchung der zelltypabhängigen Interaktion des Rev-Proteins mit hnRNP-A1 und hnRNP-Q von großem Interesse. Diese beiden Proteine waren die einzigen Proteine, die sowohl in Affinitätsreinigungen als auch in Immunpräzipitationen mit dem Rev-Protein interagierten.

Hierzu wurde eine Affinitätschromatographie mit HeLa-Zellysat durchgeführt. Anschließend wurden die Elutionsfraktionen dieser Säulenreinigung mit den Elutionsfraktionen der Astrozyten-Reinigungen (U138MG und 85HG66) verglichen.

In Abbildung 3.9 sind die Elutionsfraktionen der drei Affinitätschromatographien (85HG66-, U138MG- und HeLa-Zellysaten) dargestellt. Das Protein hnRNP-Q konnte in den RevGFP-*Strep*TagII Elutionsfraktionen aller drei Affinitätschromatographien (85HG66-, U138MG- und HeLa-Zellysaten) mit einem entsprechenden Antikörper detektiert werden. Folglich war die Interaktion dieses Proteins mit dem Rev-Protein in den untersuchten Zelllinien nicht zelltypabhängig, da es aus allen drei Zelllinien mit Rev interagierte.

In den RevGFP-*Strep*TagII Elutionsfraktion der Astrozyten-Reinigungen (U138MG und 85HG66) war das hnRNPA1-Protein vorhanden. In der RevGFP-*Strep*TagII Elutionsfraktion der HeLa-Affinitätschromatographie konnte hingegen keine hnRNP-A1 Bande nachgewiesen werden (Abbildung 3.9). Dies bestätigt die Ergebnisse der exBIFC Untersuchungen, dass hnRNP-A1 nicht mit Rev in HeLa-Zellen interagiert.

Man kann sehen, dass in den jeweiligen GFP-*Strep*TagII (GS) Elutionsfraktionen (E) keines der untersuchten zellulären Proteine detektierbar war (Abbildung 3.9). Somit stellen alle detektierten Proteinbanden zelluläre Proteine dar, die spezifisch mit Rev interagierten. Als Positivkontrolle wurde das Protein Casein Kinase 2 (CK2), welches bereits als Rev-interagierender Faktor beschrieben ist (Meggio *et al.*, 1996), ausgewählt. In den RevGFP-*Strep*TagII (RGS) Elutionsfraktionen (E) aller

Reinigungen war CK2 mit einem spezifischen Antikörper nachweisbar. Zudem konnte das Protein PABP1 in den Astrozyten- und HeLa-Reinigungen nachgewiesen werden (Abbildung 3.9).

Der Vergleich der eingesetzten Zelllysate von U138MG- und HeLa-Zellen zeigt, dass hnRNP-A1 im HeLa-Zelllysate vorhanden war (Abbildung 3.9).

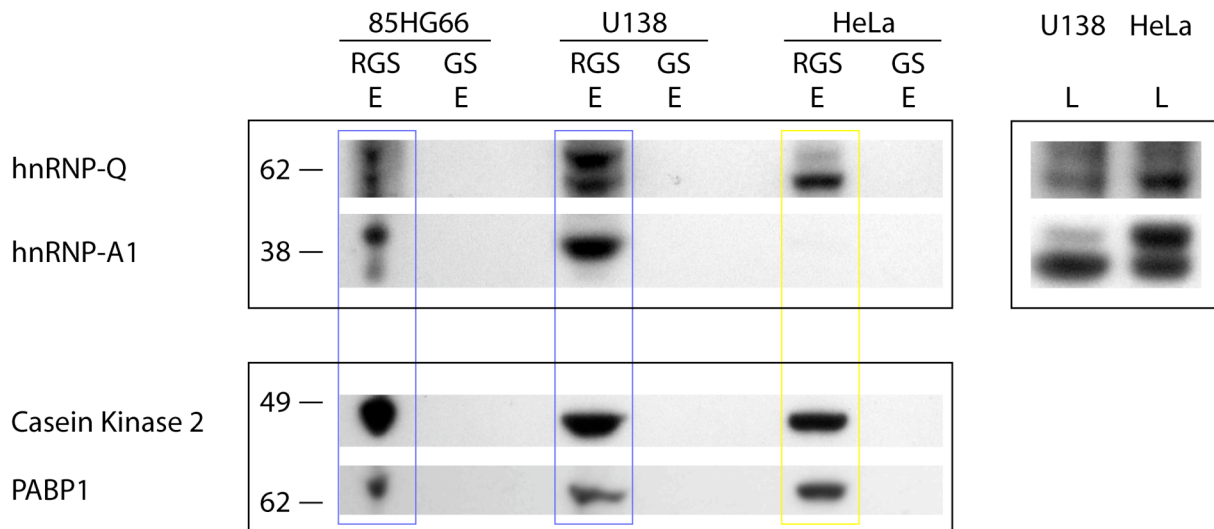


Abbildung 3.9.: Vergleich der Affinitätschromatographien von RevGFP-*StrepTagII* bzw. GFP-*StrepTagII* mit Astrozyten- und HeLa-Zelllysaten

Dargestellt sind die Elutionsfraktionen (E) aus drei Affinitätschromatographien (85HG66-, U138MG- und HeLa-Zelllysaten) mit RevGFP-*StrepTagII* (RGS) bzw. GFP-*StrepTagII* (GS). Durch Western Blot Analysen wurde das Vorhandensein unterschiedlicher Proteine geprüft. Das Protein hnRNP-Q aus Astrozyten- und HeLa-Zelllysaten interagiert mit dem Rev-Protein. Hier war keine zelltypabhängige Interaktion in den untersuchten Zelllinien zu beobachten. Das Protein hnRNP-A1 konnte in den Astrozyteneluat (85HG66 und U138MG) detektiert werden, in den HeLa-Eluaten jedoch nicht. Somit konnte keine Interaktion von hnRNP-A1 mit Rev in HeLa-Zellen nachgewiesen werden.

Als Positivkontrolle diente Casein Kinase 2 (ein bereits bekannter Rev-Interaktionspartner). Dieses Protein interagiert mit Rev unabhängig davon, aus welchem Lysat es stammt. Das gleiche Ergebnis wurde für das Protein PABP1 erzielt. In den Kontrollreinigungen (GFP-*StrepTagII*) war keines der untersuchten Proteine detektierbar.

Der Vergleich der Zelllysate zeigte, dass hnRNP-A1 und Q im eingesetzten HeLa-Zelllysate detektierbar waren.

3.3.5. Die ersten 14 Aminosäuren des Rev-Proteins interagieren mit hnRNP-A1 und hnRNP-Q

Die Proteine hnRNP-A1 und Q wurden in Vorarbeiten aus der Gruppe durch die Affinitätschromatographie mit einem N-terminalen Rev-Peptid aus Astrozytenzelllysaten isoliert (Mäusbacher, 2006). Um die Interaktion der drei Proteine mit dem N-Terminus von Rev zu zeigen, wurden N-terminale Deletionsmutanten von Rev hergestellt und Affinitätschromatographien mit diesen Mutanten durchgeführt. Zum einen wurden die Aminosäuren 2 bis 8 deletiert, zum anderen die Aminosäuren 2 bis 14. Die Aminosäuren 2 bis 14 entsprechen den Aminosäuren, die als Peptid in der früheren Studie verwendet wurden (Mäusbacher, 2006) (Abbildung 3.10).

Die Affinitätschromatographien von U138MG-Astrozytomzelllysaten mit den Proteinen $\Delta 2-8$ RevGFP-*Strep*TagII und $\Delta 2-14$ RevGFP-*Strep*TagII wurden, wie in Abschnitt 3.3.1, Abbildung 3.4 beschrieben, durchgeführt. Hierfür wurde die Expressionskassette von $\Delta 2-8$ RevGFP und $\Delta 2-14$ RevGFP vor das *Strep*TagII in den pASK-IBA3plus Vektor kloniert. Die Proteine wurden rekombinant in *E. coli* produziert. Als Kontrolle wurde parallel zu jeder Reinigung eine Affinitätschromatographie mit GFP-*Strep*TagII durchgeführt. Die Daten der beiden Reinigungen sind im Vergleich zur Affinitätschromatographie mit RevGFP-*Strep*TagII in Abbildung 3.10 dargestellt.

Es konnte nur eine sehr schwache hnRNP-Q- bzw. hnRNP-A1-Bande in der $\Delta 2-14$ RevGFP-*Strep*TagII detektiert werden. Diese Proteine waren jedoch in den Elutionsfraktionen von RevGFP-*Strep*TagII und $\Delta 2-8$ RevGFP-*Strep*TagII nachweisbar (Abbildung 3.10).

Die GFP-*Strep*TagII Reinigungen zeigten keine Interaktion von GFP-*Strep*TagII mit den untersuchten Proteinen. Als Positivkontrolle wurde erneut Casein Kinase 2 (CK2) verwendet. Dieses Protein interagiert mit RevGFP-*Strep*TagII, $\Delta 2-8$ RevGFP-*Strep*TagII und $\Delta 2-14$ RevGFP-*Strep*TagII. Es war in allen drei Elutionsfraktionen detektierbar. Das Protein PABP1 war ebenfalls in allen drei Elutionsfraktionen nachweisbar. Mit einem α Rev-Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Proteine $\Delta 2-8$ RevGFP-*Strep*TagII und $\Delta 2-14$ RevGFP-*Strep*TagII im SDS-Gel, entsprechend ihrer Größe, jeweils niedriger liefen als RevGFP-*Strep*TagII (Abbildung 3.10).

Somit konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass die Proteine hnRNP-A1 und hnRNP-Q mit dem N-Terminus von HIV-1 Rev interagieren.

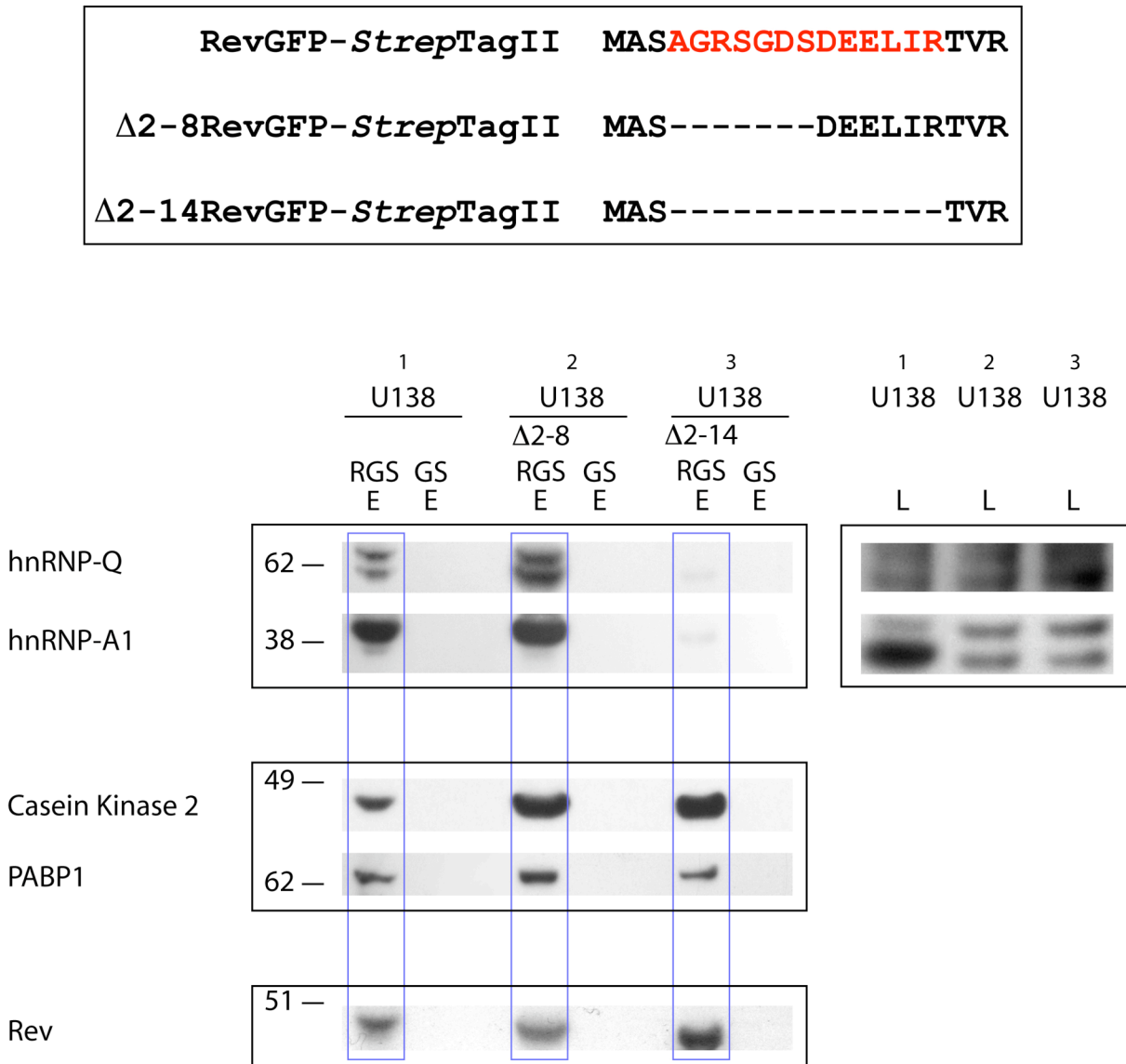


Abbildung 3.10.: Interaktion von hnRNP-Q und hnRNP-A1 mit dem N-Terminus von Rev in Astrozyten

Die Elutionsfraktionen (E) aus den Affinitätschromatographien (U138MG-Zelllysaten) mit RevGFP-*StrepTagII* (RGS), Δ2-8RevGFP-*StrepTagII* und Δ2-14RevGFP-*StrepTagII* sind dargestellt. Als Kontrolle wurde jeweils eine Reinigung mit GFP-*StrepTagII* durchgeführt.

Die Proteine hnRNP-Q und A1 waren in den Wildtyp-RevGFP-*StrepTagII* und Δ2-8RevGFP-*StrepTagII* Elutionsfraktionen detektierbar. Der Nachweis von hnRNP-A1 und hnRNP-Q in der Elutionsfraktion der Δ2-14RevGFP-*StrepTagII* Reinigung war im Vergleich zu den Elutionsfraktionen der anderen Reinigungen nur sehr schwach möglich.

Als Positivkontrolle wurde Casein Kinase 2 untersucht. Dieses Protein interagiert mit Wildtyp-Rev und den beiden Rev-Deletionsmutanten. Das Protein PABP1 war ebenfalls in allen drei Elutionsfraktionen der Rev-Varianten zu sehen.

Der Vergleich der Zelllysate (L) zeigte, dass die Proteine hnRNP-Q und A1 in dem eingesetzten U138MG-Zelllysate für die Δ2-14RevGFP-*StrepTagII* Reinigung detektierbar waren.

3.4. Untersuchung der Produktion des Reporterproteins im Rev-abhängigen Reportersystem unter dem Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q

3.4.1. Untersuchung der Aktivität N-terminaler RevGFP-Deletionsmutanten

In dieser Arbeit konnte die spezifische Interaktion von hnRNP-A1 und Q mit den ersten 14 Aminosäuren von Rev gezeigt werden. Deshalb wurde im nächsten Teil der Arbeit die Bedeutung dieser Region für die Aktivierungsfunktion von Rev untersucht. Hierzu wurde die Produktion des Reporterproteins im Reportersystems (Wolff, 2003) nach Expression der zwei Rev-Deletionsmutanten ($\Delta 2-8$ RevGFP und $\Delta 2-14$ RevGFP) analysiert. Die Untersuchungen wurden sowohl in HeLa-Zellen als auch in Astrozyten durchgeführt und jeweils auf RevGFP bezogen.

Die Experimente in HeLa-Zellen erfolgten mit den HeLaTatROD Zellen, welche stabil sowohl das Tat-Protein als auch die Rev und Tat-abhängige Reporter-mRNA exprimieren (siehe Abschnitt 2.2.2.7.1). Es wurden jeweils fünf unabhängige Experimente durchgeführt. Die Daten der Wildtyp-RevGFP-Funktionsanalyse wurden auf 100 % gesetzt und die Ergebnisse der Funktionsanalyse mit den Deletionsmutanten darauf bezogen. Hierbei zeigte sich, dass die $\Delta 2-8$ RevGFP-Deletionsmutante die gleiche Aktivierungsfunktion wie Wildtyp-RevGFP besaß. Die $\Delta 2-14$ RevGFP-Deletionsmutante zeigte jedoch im Vergleich zu Rev-GFP nur etwa 50 % Aktivität (Abbildung 3.11). In dieser Abbildung sind Fluoreszenzaufnahmen zu den drei RevGFP-Varianten dargestellt. Die $\Delta 2-14$ RevGFP-Mutante zeigte eine stärkere zytoplasmatische Lokalisation als Wildtyp-RevGFP und die $\Delta 2-8$ RevGFP-Mutante.

Diese Daten zeigen, dass die ersten 14 Aminosäuren von Rev einen Einfluss auf die Aktivierungsfunktion und auf die intrazelluläre Lokalisation von Rev in HeLa-Zellen haben. Allerdings reichen die ersten 8 Aminosäuren nicht aus, um eine sichtbare Lokalisationsänderung und Funktionsänderung in diesem Test zu bewirken.

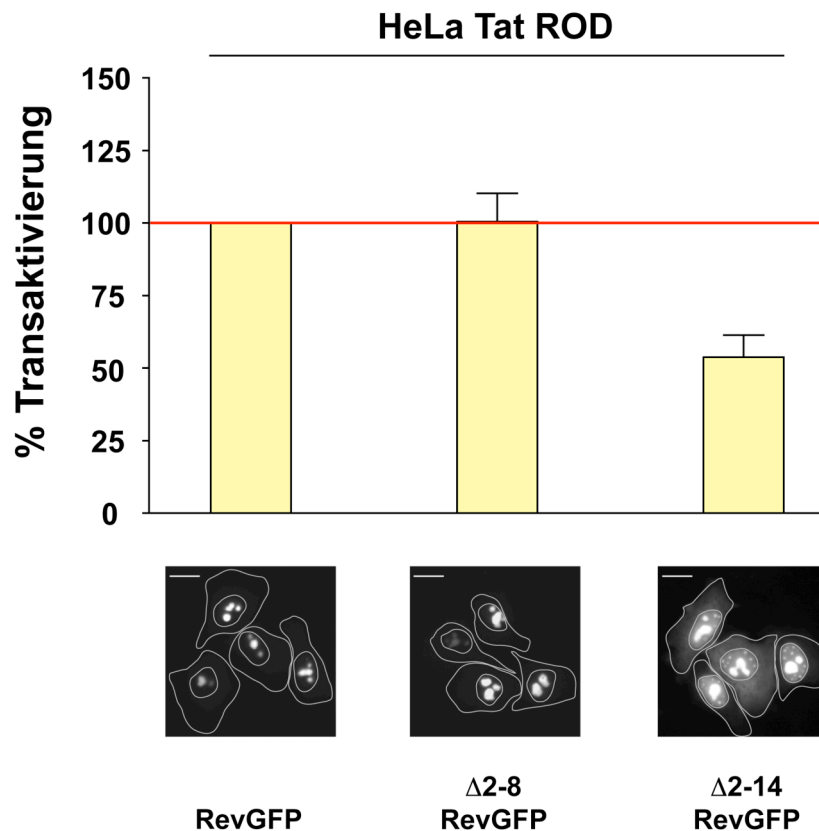


Abbildung 3.11.: Untersuchung der Aktivierungsfunktion von RevGFP, $\Delta 2-8$ RevGFP und $\Delta 2-14$ RevGFP in HeLa-Zellen

Je fünf unabhängige Experimente mit drei Rev-Varianten (RevGFP, $\Delta 2-8$ RevGFP und $\Delta 2-14$ RevGFP) wurden in HeLaTat ROD Zellen durchgeführt. Hierbei war zu sehen, dass die $\Delta 2-8$ RevGFP-Mutante identische Aktivierungsfähigkeit wie Wildtyp-RevGFP im Reportersystem besaß. Die $\Delta 2-14$ RevGFP Mutante erreichte jedoch nur etwa 50% der Aktivität von RevGFP. Die Lokalisation der drei RevGFP-Varianten ist in Fluoreszenzaufnahmen dargestellt. Maßstab: 20 μ m

In U138MG-Astrozytom Zellen wurden die Funktionsuntersuchungen mit den zwei N-terminalen Deletionsmutanten nach transienter Expression aller notwendigen Komponenten (Reporter, Tat und Rev-Variante) durchgeführt.

In Abbildung 3.12 sind die Daten von je fünf unabhängigen Experimenten mit Rev-GFP, $\Delta 2-8$ RevGFP bzw. $\Delta 2-14$ RevGFP dargestellt. Die Ergebnisse der Funktionsuntersuchung mit Wildtyp-RevGFP wurden für die Darstellung auf 100 % gesetzt und die Daten der Deletionsmutanten darauf bezogen. Im direkten Vergleich

zu HeLa-Zellen zeigt Rev in Astrozyten jedoch nur etwa 40 % Aktivierungsfunktion (siehe Abbildung 3.2) (Wolff *et al.*, 2006a).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass in Astrozyten die $\Delta 2-8$ RevGFP-Deletionsmutante die Produktion des Reporterproteins im Vergleich zu Wildtyp-RevGFP leicht steigerte. Die $\Delta 2-14$ RevGFP-Mutante besaß etwa die gleiche Aktivierungsfunktion wie Wildtyp-RevGFP in Astrozyten. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen die intrazelluläre Lokalisation von RevGFP und der beiden Deletionsmutanten. Auch in Astrozyten besaß die $\Delta 2-14$ RevGFP-Mutante eine veränderte Lokalisation im Vergleich zu Wildtyp-RevGFP. In diesen Zellen lokalisierte $\Delta 2-14$ RevGFP stärker im Zellkern als RevGFP (Abbildung 3.12).

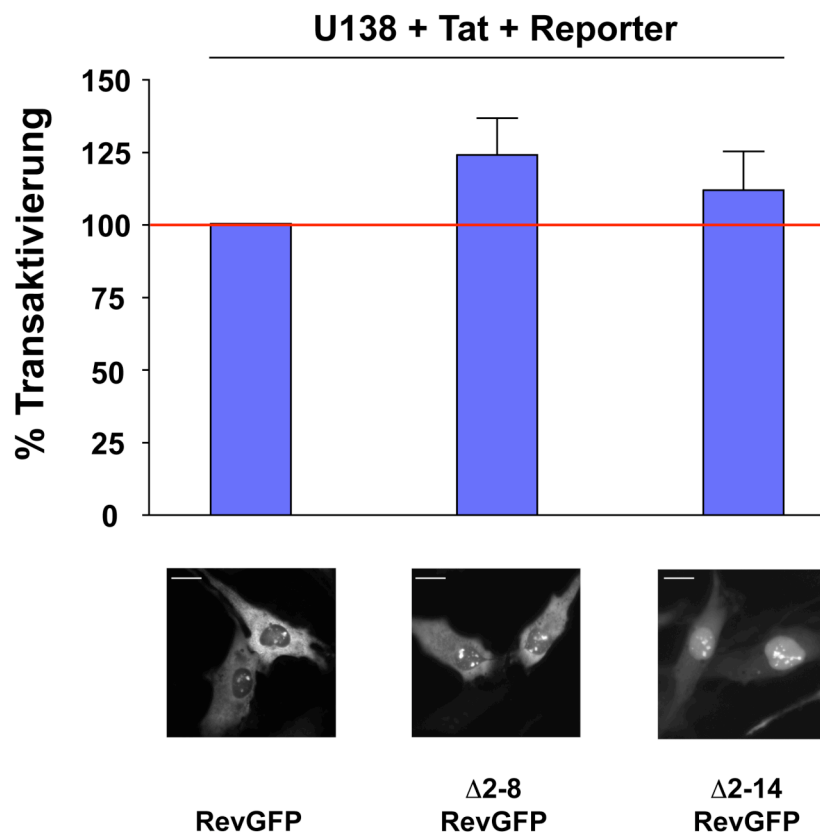


Abbildung 3.12.: Untersuchung der Aktivierungsfunktion von RevGFP, $\Delta 2-8$ RevGFP und $\Delta 2-14$ RevGFP in Astrozyten

In Astrozyten wurden die drei Rev-Varianten (RevGFP, $\Delta 2-8$ RevGFP und $\Delta 2-14$ RevGFP) nach Expression mit dem Reporter- und dem Tat-Konstrukt in fünf unabhängigen Experimenten auf ihre Transaktivierungsfähigkeit im Reportersystem untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die $\Delta 2-8$ RevGFP-Mutante eine etwas höhere Aktivierungsfunktion als Wildtyp-RevGFP besaß, die $\Delta 2-14$ RevGFP Mutante hingegen etwa die gleiche. Fluoreszenzaufnahmen zeigen die Lokalisation der drei RevGFP-Varianten. Maßstab: 20 μ m

Im Rev-Reportersystem konnte eine unterschiedliche Funktionalität der $\Delta 2-14$ RevGFP Deletionsmutante in HeLa-Zellen (Abbildung 3.11) im Vergleich zu Astrozyten (Abbildung 3.12) gezeigt werden.

In HeLa-Zellen konnte eine Reduktion der $\Delta 2-14$ RevGFP-Aktivierungsfunktion von etwa 50 % im Vergleich zu Wildtyp-RevGFP beobachtet werden. Der Vergleich der Aktivierungsfunktionen von $\Delta 2-14$ RevGFP mit Wildtyp-RevGFP in Astrozyten zeigte dagegen kaum einen Unterschied.

3.4.2. Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die Produktion des Reporterproteins im Reportersystem nach Co-Expression mit RevGFP

Mit Hilfe des Rev-Reportersystem (Wolff, 2003) wurde untersucht, ob die Proteine hnRNP-A1 und hnRNP-Q eine Veränderung der Produktion des Reporterproteins bewirken können.

Für die Expression dieser Rev-interagierenden Proteine wurden die DNA-Konstrukte pC-hnRNP-A1-CFP-YFP-N und pC-hnRNP-Q-CFP-YFP-N verwendet. Die Untersuchungen erfolgten in HeLaTatROD Zellen und in U138MG-Astrozytom Zellen. Die HeLaTatROD Zellen exprimieren die Konstrukte für den *DsRed1*-Reporter und für die Tat-Expression stabil. In den Astrozyten wurden das Reporterkonstrukt und das Expressionsplasmid für das Tat Protein transient transfiziert. Die Auswertung der *DsRed1*-Produktion erfolgte mittels FACS Analyse 48 Stunden nach Transfektion (siehe Abschnitt 2.2.2.7.1). In beiden Zelllinien wurden die Ergebnisse aus den Einzelwerten von je drei unabhängigen Experimenten gebildet.

Als Kontrolle wurde in beiden Zelllinien bei jeder Versuchsreihe das CFP-YFP-N (CYN) zusammen mit RevGFP exprimiert und die resultierende Reporterprotein-Produktion ermittelt. Dies wurde durchgeführt, um zu zeigen, dass das CYN alleine keinen Einfluss auf die Produktion des Reporterproteins besitzt. Die Werte der Reporterprotein-Produktion nach Co-Expression von RevGFP mit CYN wurden auf 100% gesetzt und weitere gemessene Werte darauf bezogen.

Zunächst wurde untersucht, ob die Proteine hnRNP-A1 und Q in Abwesenheit von Rev einen Einfluss auf die Reporterprotein-Produktion haben. Hierzu wurden die Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN zusammen mit GFP in HeLaTatROD Zellen co-exprimiert und die Reporterprotein-Produktion beobachtet. Abbildung 3.13/A zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. Die Reporterprotein-Produktion der Positivkontrolle, RevGFP co-exprimiert mit CYN, wurde auf 100% gesetzt und die restlichen Daten darauf bezogen. Die Expression von GFP zusammen mit CYN zeigte etwa 14 % Reporterprotein-Produktion. Die Co-Expression der beiden Proteine hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN zusammen mit GFP veränderte die Produktion des Reporterproteins nicht nennenswert. Als Bestätigung, dass die Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN, hnRNP-Q-CYN und GFP in den Zellen exprimiert wurden, wurde diese Proteine im Western Blot mit einem Ratte- α GFP-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 3.13/B).

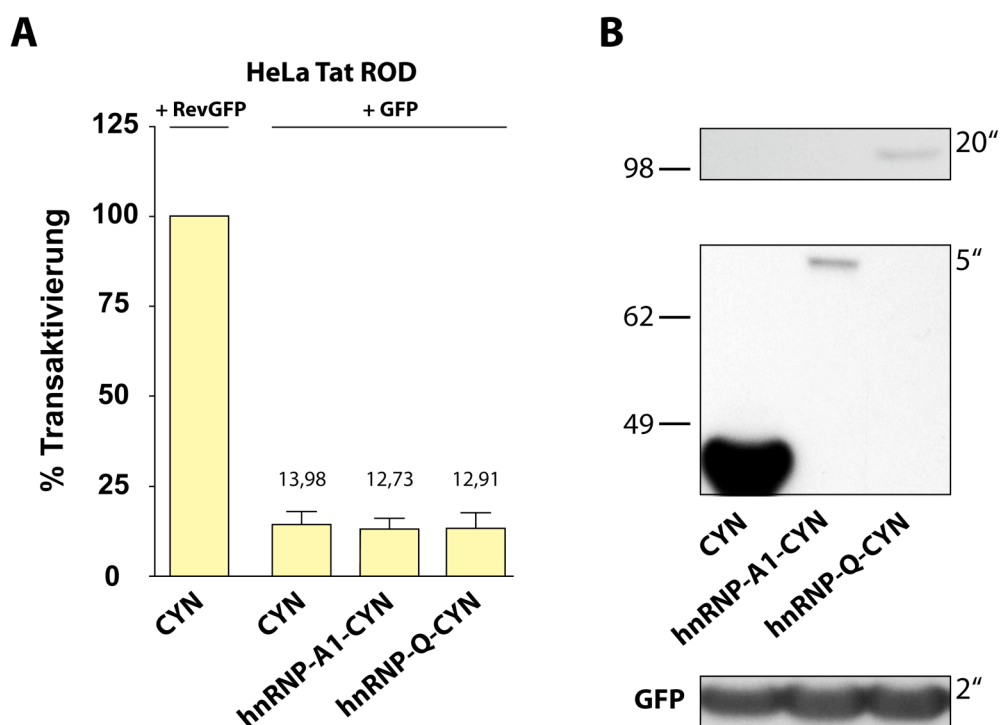


Abbildung 3.13.: Einfluss der identifizierten Rev-interagierenden Proteine auf die Produktion des Reporterproteins in HeLa-Zellen in Abwesenheit von RevGFP

(A) Die Untersuchungen erfolgten in drei unabhängigen Experimenten. Die Reporterprotein-Produktion nach Co-Expression von RevGFP mit CYN wurde auf 100 % gesetzt und weitere Daten darauf bezogen. Nach Expression von GFP mit CYN konnte etwa 14 % Reporterprotein-Produktion ermittelt werden. Die Proteine hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN hatten nach Co-Expression mit GFP keinen bedeutsamen Einfluss auf die Reporterprotein-Produktion. (B) Alle in dieser Untersuchung exprimierten Proteine waren mit einem Ratte- α GFP-Antikörper in den jeweiligen Zelllysaten nachweisbar. Die Expositionszeiten sind in der Abbildung angegeben.

Der Einfluss der Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN auf die Reporterprotein-Produktion zusammen mit GFP wurde auch in Astrozyten bestimmt. Abbildung 3.14/A zeigt die Daten zu diesem Experiment.

Die Reporterprotein-Produktion von RevGFP co-exprimiert mit CYN wurde auf 100 % gesetzt und die weiteren Ergebnisse darauf bezogen. Die Expression des GFP-Proteins zusammen mit CYN, hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN führte in allen Fällen zu etwa 12 % Reporterprotein-Produktion. Somit konnte auch in Astrozyten kein nennenswerter Einfluss der Proteine hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN auf die Reporterprotein-Produktion zusammen mit GFP erzielt werden. Western Blot Analysen zeigten, dass die Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN, hnRNP-Q-CYN und GFP in den Zellen exprimiert wurden (Abbildung 3.14/B).

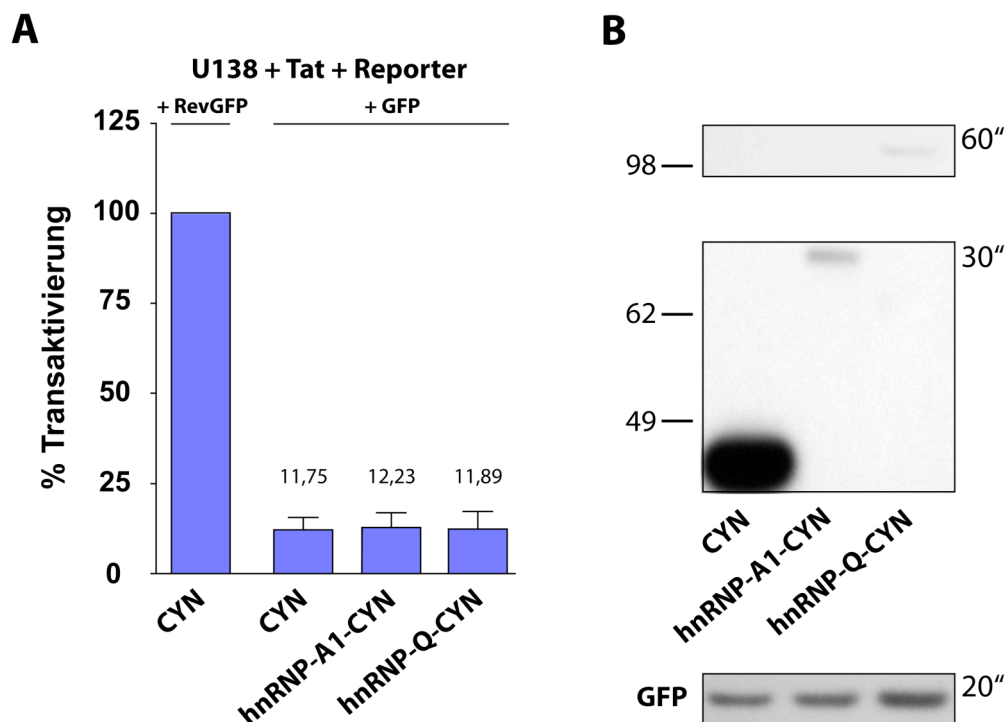


Abbildung 3.14.: Einfluss der identifizierten Rev-interagierenden Proteine auf die Produktion des Reporterproteins in Astrozyten in Abwesenheit von RevGFP

(A) Die Untersuchungen erfolgten in drei unabhängigen Experimenten. Die Expression von RevGFP zusammen mit CYN wurde als Positivkontrolle durchgeführt und die Reporterprotein-Produktion auf 100 % gesetzt. Die Co-Expression von GFP mit CYN, hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN zeigte in allen Experimenten etwa 12 % Reporterprotein-Produktion. Demnach hatten die hnRNP-Proteine nach Co-Expression mit GFP in Astrozyten ebenfalls keinen bedeutsamen Einfluss auf die Produktion des Reporterproteins. (B) Die Proteine aller transfizierten Konstrukte konnten mit einem Ratte- α GFP-Antikörper in den jeweiligen Zelllysaten nachgewiesen werden. Die Expositionszeiten sind in der Abbildung angegeben.

Der Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die Reporterprotein-Produktion nach Co-Expression mit RevGFP in HeLa-Zellen ist in Abbildung 3.15/A dargestellt. Die Expression von hnRNP-A1-CYN, zusammen mit RevGFP, führte zu einer Steigerung der Reporterprotein-Produktion um etwa 30 – 40 %. Das hnRNP-Q-CYN Protein konnte bei Co-Expression mit RevGFP die Produktion des Reporterproteins um etwa 80 % erhöhen. Die Expression der Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN, hnRNP-Q-CYN und RevGFP konnte in Western Blot Analysen mit einem Ratte- α GFP-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 3.15/B).

Somit konnte eine Steigerung der Reporterprotein-Produktion nach Expression von hnRNP-A1 bzw. hnRNP-Q zusammen mit RevGFP erzielt werden.

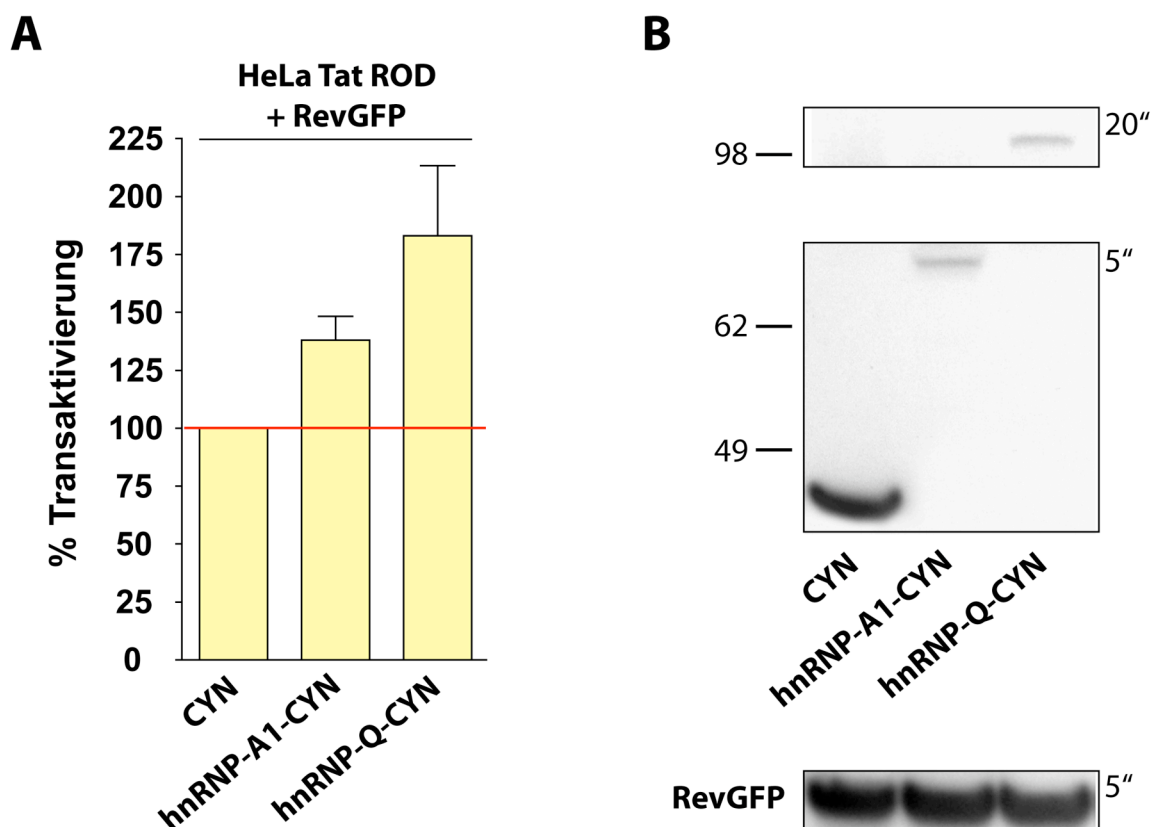


Abbildung 3.15.: Einfluss der identifizierten Rev-interagierenden Proteine auf die Produktion des Reporterproteins in HeLa-Zellen

(A) Die Funktionsuntersuchungen in HeLa-Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Als Kontrolle wurde stets CFP-YFP-N (CYN) zusammen mit RevGFP exprimiert und die Reporterprotein-Produktion ermittelt. Dieser Wert wurde auf 100 % gesetzt und die restlichen Daten der Experimentreihe darauf bezogen. Die Co-Expression von hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN mit RevGFP führte zu einer Steigerung der Reporterprotein-Produktion um etwa 40 % bzw. 80 %.

(B) Nachweis der Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN, hnRNP-Q-CYN und RevGFP nach Expression in HeLa-Zellen mit einem Ratte- α GFP-Antikörper. Es ist zu sehen, dass diese Proteine in den analysierten Funktionsansätzen exprimiert wurden. Die Expositionszeiten sind in der Abbildung angegeben.

In Astrozyten konnte hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN nach Co-Expression mit RevGFP die Reporterprotein-Produktion im Vergleich zu der Kontrolle um etwa 20 % bzw. 30 % steigern. Diese Daten sind in Abbildung 3.16/A dargestellt. Die Expression der Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN, hnRNP-Q-CYN und RevGFP konnte mit einem Ratte- α GFP-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 3.16/B).

Demnach besitzen die Rev-interagierenden Faktoren hnRNP-A1 und hnRNP-Q nach Co-Expression mit RevGFP in Astrozyten einen ähnlichen Einfluss auf die Reporterprotein-Produktion wie in HeLa-Zellen. Dieser Einfluss war in Astrozyten jedoch geringer als in HeLa-Zellen.

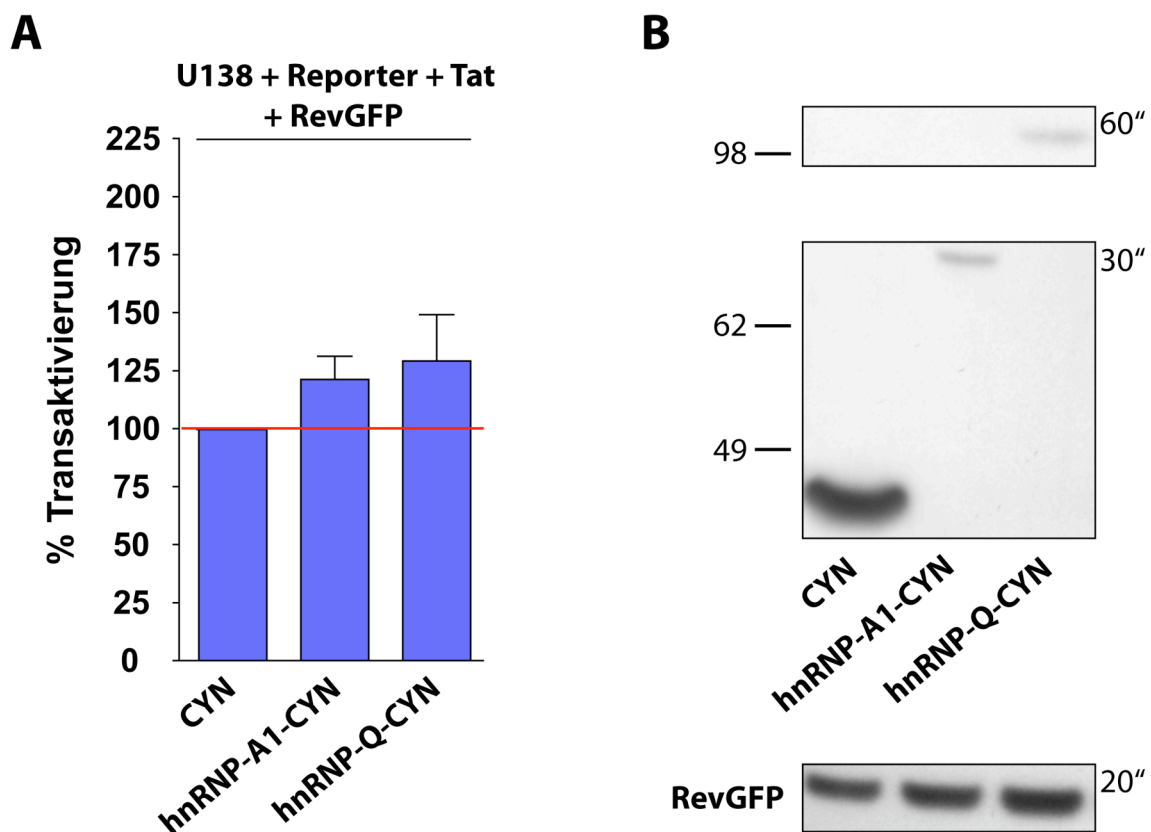


Abbildung 3.16.: Einfluss der identifizierten Rev-interagierenden Proteine auf die Produktion des Reporterproteins in U138MG-Astrozytom Zellen

(A) In Astrozyten wurden die Funktionsuntersuchungen mit den Rev-interagierenden Faktoren ebenfalls in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Als Kontrolle wurden CFP-YFP-N (CYN) und RevGFP co-exprimiert und die Produktion des Reporterproteins bestimmt. Dieser Wert wurde für die Darstellung auf 100 % gesetzt und die restlichen Ergebnisse darauf bezogen. Die Proteine hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN steigerten die Produktion des Reporterproteins um etwa 20 % bzw. 30 % nach Co-Expression mit RevGFP. (B) In Western Blot Analysen konnte die Expression der Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN in Astrozyten mit einem Ratte- α GFP-Antikörper nachgewiesen werden. Die Expositionszeiten sind in der Abbildung angegeben.

Das Protein hnRNP-A1 lässt sich anhand seiner funktionellen Domänen in zwei Hälften unterteilen. Die erste Hälfte enthält zwei RNA-Bindungsmotive (RRM-Domänen) und die zweite Hälfte RGG-Wiederholungen bzw. die M9-Shuttlesequenz. Das hnRNP-Q Protein lässt sich nicht wie hnRNP-A1 in funktionelle Hälften unterteilen. HnRNP-Q besitzt etwa in der Mitte seiner Primärstruktur drei RRM-Domänen und am Ende RGG-Wiederholungen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die einzelnen Hälften von hnRNP-A1 einen Einfluss auf die Reporterprotein-Produktion haben. Diese Untersuchungen wurden sowohl in HeLa-Zellen als auch in Astrozyten durchgeführt. Die Proteinhälfte von hnRNP-A1 wurden als Fusionsproteine mit CFP-YFP-N (CYN) in beiden Zelllinien exprimiert. Als Kontrolle wurde erneut die Reporterprotein-Produktion nach Co-Expression von RevGFP zusammen mit CYN bestimmt und alle weiteren Daten darauf bezogen.

Die Ergebnisse der Funktionsanalysen mit den einzelnen hnRNP-A1 Hälften in HeLa-Zellen ist in Abbildung 3.17/A dargestellt. Es ist zu sehen, dass die einzelnen Hälften nach Co-Expression mit RevGFP keine Veränderung der Reporterprotein-Produktion im Vergleich zur Kontrolle hervorrufen. Die hnRNP-A1 Proteinhälften und RevGFP wurden nach Transfektion in HeLa-Zellen exprimiert (Abbildung 3.17/B). Die Expression der entsprechenden Proteine konnten mittels Western Blot nachgewiesen werden.

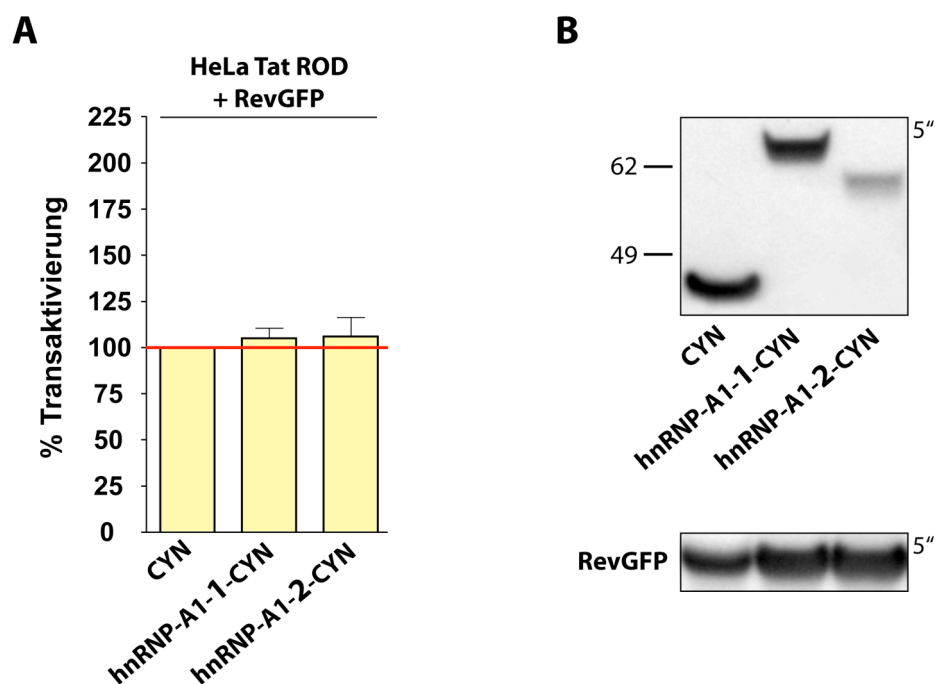


Abbildung 3.17. (vorherige Seite): Einfluss der hnRNP-A1 Hälften auf die Produktion des Reporterproteins in HeLa-Zellen

(A) Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Produktion des Reporterproteins nach Co-Expression von RevGFP mit CFP-YFP-N (CYN) bestimmt. Dieser Wert wurde auf 100 % gesetzt und die weiteren Ergebnisse der Experimentreihe darauf bezogen. Die Expression der beiden hnRNP-A1 Hälften, zusammen mit RevGFP, hatte keinen Einfluss auf die Reporterprotein-Produktion. (B) Beide Proteinhälften und RevGFP wurden in HeLa-Zellen exprimiert und konnten im Western Blot mit einem Ratte- α GFP-Antikörper nachgewiesen werden. Die Expositionszeiten sind in der Abbildung angegeben.

Auch in Astrozyten hatte die Expression der beiden hnRNP-A1 Proteinhälften, zusammen mit RevGFP, keinen Einfluss auf die Produktion des Reporterproteins im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.18/A). Abbildung 3.18/B zeigt, dass die einzelnen Proteinhälften bzw. RevGFP exprimiert wurden. Diese konnten mit einem Ratte- α GFP-Antikörper detektiert werden.

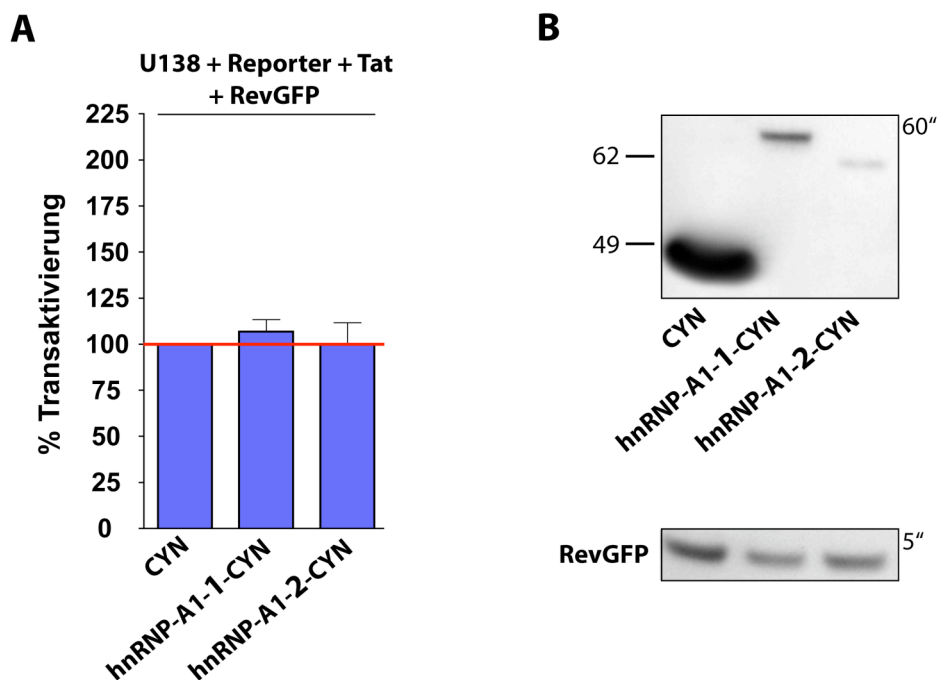


Abbildung 3.18.: Einfluss der hnRNP-A1 Hälften auf die Produktion des Reporterproteins in Astrozyten

(A) Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und CFP-YFP-N (CYN) als Kontrolle verwendet. Die hnRNP-A1 Hälften zeigten nach Co-Expression mit RevGFP in Astrozyten ebenfalls keinen Einfluss auf die Reporterprotein-Produktion. (B) Die Expression der hnRNP-A1 Proteinhälften bzw. RevGFP konnte im Western Blot mit einem Ratte- α GFP-Antikörper gezeigt werden. Die Expositionszeiten sind in der Abbildung angegeben.

3.4.3. Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die Produktion des Reporterproteins im Reportersystem nach Co-Expression mit N-terminalen Rev-Deletionsmutanten

Die Untersuchung der Reporterprotein-Produktion nach Expression der Proteine hnRNP-A1 und Q wurde des Weiteren zusammen mit den Deletionsmutanten $\Delta 2-8\text{RevGFP}$ bzw. $\Delta 2-14\text{RevGFP}$ durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Proteine hnRNP-A1 und Q ebenso die Produktion des Reporterproteins verändern, wenn der N-terminale Bereich von Rev, der für die Interaktion mit diesen beiden Proteinen notwendig ist, fehlt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proteine hnRNP-A1 und Q eine Bindung mit dem N-Terminus eingehen (siehe Abschnitt 3.3.5).

Jeweils drei unabhängige Versuche wurden in HeLa-Zellen und U138MG-Astrozytom Zellen durchgeführt. Die Reporterprotein-Produktion nach Co-Expression von RevGFP mit CYN diente als Wildtyp-Kontrolle und wurde in beiden Zelllinien auf 100 % gesetzt. Die Funktionsanalysen mit den beiden Deletionsmutanten co-exprimiert mit CYN, hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN innerhalb jeder Zelllinie wurden jeweils darauf bezogen.

Für die Bestimmung der Funktionsunterschiede der jeweiligen Deletionsmutanten nach Expression der Proteine hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN wurden die ermittelten Aktivierungsfunktionen mit denen der CYN-Kontrolle verglichen.

Die Funktionsuntersuchungen in HeLa-Zellen sind in Abbildung 3.19 dargestellt.

Die Expression von $\Delta 2-8\text{RevGFP}$, zusammen mit den beiden hnRNP-Proteinen, führte zu einer Steigerung der Reporterprotein-Produktion. hnRNP-A1-CYN hob die Reporterprotein-Produktion um etwa 30 – 40 %, hnRNP-Q-CYN um etwa 100 % an (Abbildung 3.19/A). Abbildung 3.19/B zeigt die Daten der Funktionsanalysen mit der $\Delta 2-14\text{RevGFP}$ Deletionsmutante. Die Proteine hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN erhöhten die Reporterprotein-Produktion von etwa 50 % auf etwa 90 % bzw. etwa 110 %.

In Abbildung 3.19/C und D sind jeweils Western Blot Analysen zu den Funktionsuntersuchungen mit den beiden Deletionsmutanten dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN, hnRNP-Q-CYN und RevGFP exprimiert wurden.

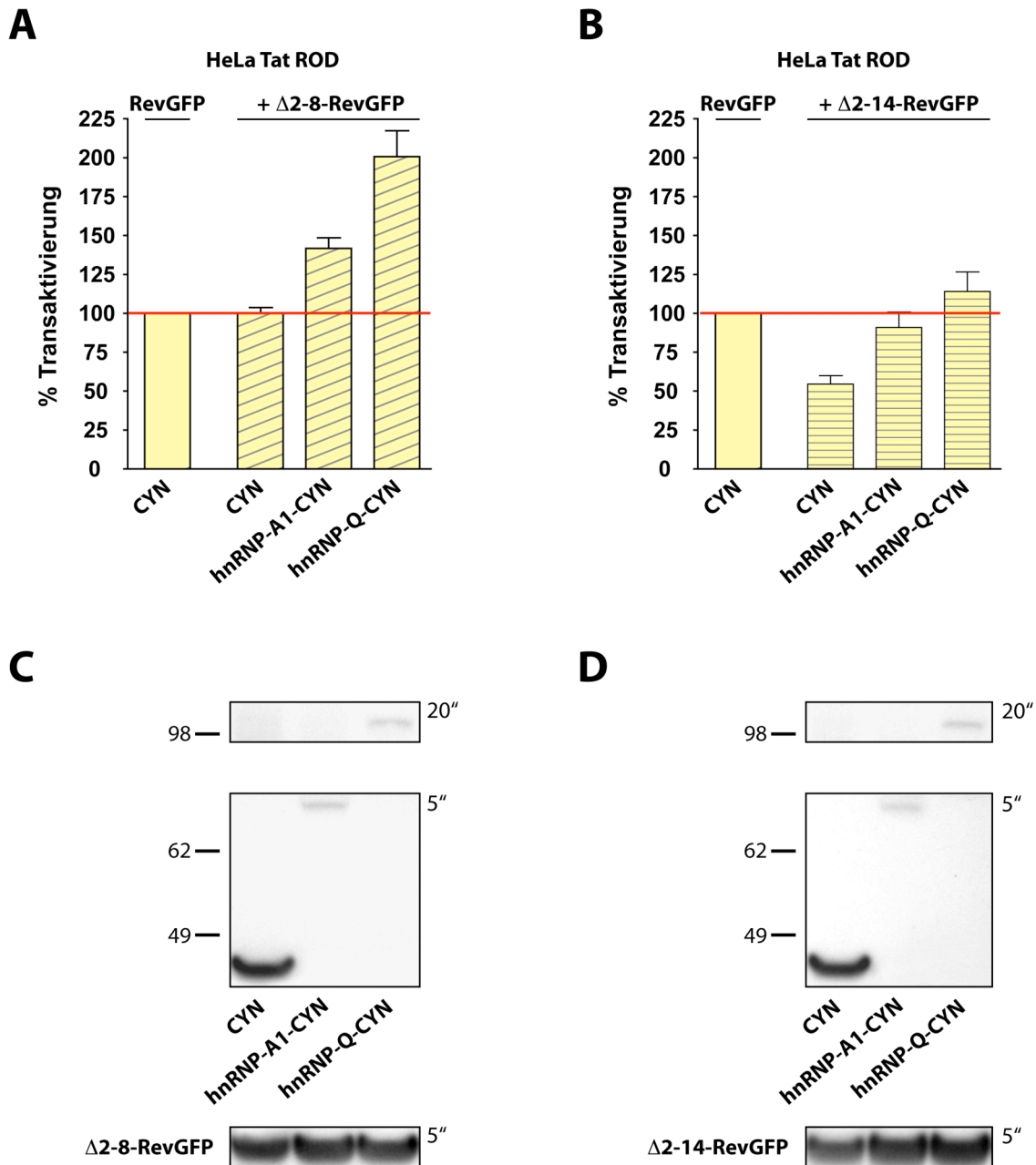


Abbildung 3.19.: Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die Produktion des Reporterproteins nach Co-Expression mit $\Delta 2-8$ RevGFP- bzw. $\Delta 2-14$ RevGFP in HeLa-Zellen

Die Funktionsexperimente mit $\Delta 2-8$ RevGFP- bzw. $\Delta 2-14$ RevGFP wurden je dreimal wiederholt.

Die Reporterprotein-Produktion nach Expression von Wildtyp-RevGFP mit CYN wurde auf 100% gesetzt und die Werte der Funktionsanalysen mit den Deletionsmutanten darauf bezogen. Die CFP-YFP-N (CYN) Expression mit den Deletionsmutanten diente als Kontrolle.

(A) Die Expression von $\Delta 2-8$ RevGFP, zusammen mit hnRNP-A1-CYN bzw. hnRNP-Q-CYN, in HeLa-Zellen führte zu einer Erhöhung der Reporterprotein-Produktion um etwa 30 - 40 % bzw. 100 %. (B) Auch hier ist eine Erhöhung der Produktion des Reporterproteins nach Expression von hnRNP-A1-CYN (ca. 40 %) bzw. hnRNP-Q-CYN (etwa 60 %) zu sehen. (C und D) Die Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN, hnRNP-Q-CYN und RevGFP konnten in den Funktionsansätzen mit einem Ratte- α GFP-Antikörper nachgewiesen werden. Die Expositionszeiten sind in der Abbildung angegeben.

In Astrozyten konnten hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN co-exprimiert mit $\Delta 2-8$ RevGFP auch die Reporterprotein-Produktion erhöhen. Die Steigerung war in Astrozyten jedoch geringer als in HeLa-Zellen und lag bei etwa 20 % bzw. etwa 30 % gegenüber der Kontrolle (CYN) (Abbildung 3.20/A). Etwa die gleichen Ergebnisse ergaben sich bei den Funktionsuntersuchungen mit der $\Delta 2-14$ RevGFP Deletionsmutante und hnRNP-A1-CYN bzw. hnRNP-Q-CYN (Abbildung 3.20/B).

Auch in Astrozyten wurden die Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN, hnRNP-Q-CYN und RevGFP exprimiert (Abbildung 3.20/C und D). In Western Blot Analysen konnten mit einem Ratte- α GFP-Antikörper entsprechende Banden detektiert werden.

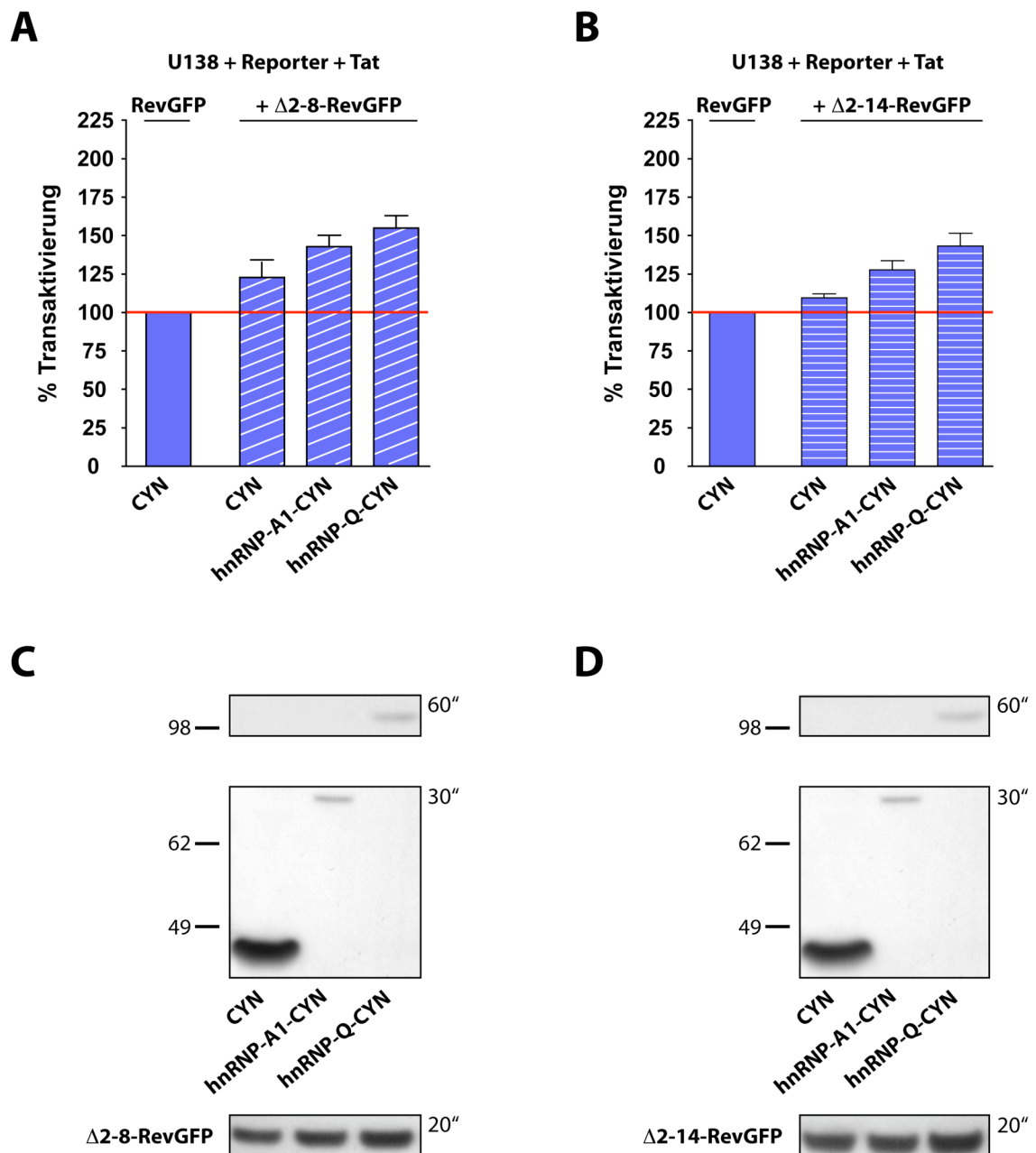


Abbildung 3.20. (vorherige Seite): Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die Produktion des Reporterproteins nach Co-Expression mit $\Delta 2$ -8RevGFP- bzw. $\Delta 2$ -14RevGFP in Astrozyten

Der Einfluss der Rev-interagierenden Faktoren auf die Reporterprotein-Produktion nach Co-Expression mit $\Delta 2$ -8RevGFP bzw. $\Delta 2$ -14RevGFP wurde in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Produktion des Reporterproteins nach Expression von Wildtyp-RevGFP zusammen mit CYN wurde bestimmt, jeweils auf 100 % gesetzt und die Daten der Deletionsmutanten darauf bezogen. CFP-YFP-N (CYN) co-exprimiert mit den Deletionsmutanten wurde als Kontrolle verwendet. **(A)** hnRNP-A1-CYN bzw. hnRNP-Q-CYN co-exprimiert mit $\Delta 2$ -8RevGFP konnten in Astrozyten die Reporterprotein-Produktion um etwa 20 % bzw. 30 % steigern. **(B)** Die Veränderung der Reporterprotein-Produktion nach Expression von $\Delta 2$ -14RevGFP zusammen mit hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN war ähnlich wie die Veränderung der Reporterprotein-Produktion durchgeführt mit $\Delta 2$ -8RevGFP und den Rev-interagierenden Faktoren (siehe A). **(C und D)** Die Proteine CYN, hnRNP-A1-CYN, hnRNP-Q-CYN und RevGFP waren auch in Astrozyten im Western Blot mit einem Ratte- α GFP-Antikörper nachweisbar. Die Expositionszeiten sind in der Abbildung angegeben.

Die Ergebnisse dieser Funktionsanalysen in HeLa-Zellen und Astrozyten zeigen, dass die Expression der Proteine hnRNP-A1 und hnRNP-Q, zusammen mit Wildtyp-RevGFP oder mit den Deletionsmutanten ($\Delta 2$ -8RevGFP und $\Delta 2$ -14RevGFP), die Reporterprotein-Produktion steigert.

3.5. Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die HIV-1 Replikation

Das Rev-Reportersystem enthält einige Komponenten des HIV Genoms und ist Tat und Rev abhängig. Trotzdem stellt es ein artifizielles System dar, das viele Aspekte der HIV-1 Replikation nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund wurden Funktionsanalysen ebenfalls in chronisch HIV-1 infizierten Zellen durchgeführt. Hierbei wurde die p24 Menge im Überstand (freies Virus) und in der Zelle nach Expression von hnRNP-A1 und hnRNP-Q analysiert. Das Protein p24 ist ein spätes Genprodukt in der HIV-1 Replikation. Durch die Bestimmung der p24 Menge im Überstand und im Zelllysate nach Expression von hnRNP-A1-CYN bzw. hnRNP-Q-CYN im Vergleich zu der Kontrolle CYN kann die relative Produktion von freien Viren und intrazellulärem p24 ermittelt werden. Die Untersuchungen wurden in chronisch HIV-1 infizierten Astrozytomzellen (TH4-7-5) und chronisch HIV-1 infizierten HeLa-Zellen (LC5-HIV) durchgeführt. Diese Zellen haben das HIV-1 Genom als Provirus integriert und produzierten anhaltend HI-Viren.

Abbildung 3.21 zeigt die extra- und intrazelluläre p24 Produktion in unbehandelten LC5-HIV bzw. TH4-7-5 Zellen nach 72 Stunden Inkubation. In LC5-HIV Zellen wird etwa 25-mal mehr p24 (extra- und intrazellulär) gebildet als in TH4-7-5 Zellen.

Diese beiden Zelllinien wurden für die nachfolgenden Analysen ausgewählt, um jeweils den Einfluss von hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN auf eine stark und eine schwach HIV-1 produzierende Zelllinie zu untersuchen.

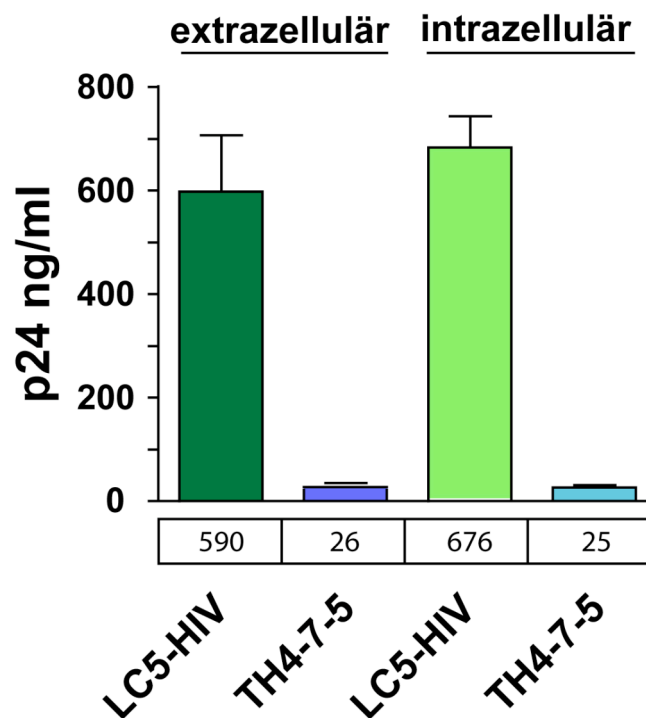


Abbildung 3.21.: Vergleich der p24-Genexpression in LC5-HIV und TH4-7-5 Zellen

Die p24-Genexpression von chronisch infizierten HeLa-Zellen (LC5-HIV) und chronisch infizierten Astrozytomzellen (TH4-7-5) wurde untersucht. Die p24 Produktion im Zellüberstand und in den Zellen wurde nach 72 Stunden mittels ELISA bestimmt. Die LC5-HIV Zellen produzierten sowohl extrazellulär als auch intrazellulär etwa 25-mal mehr p24 als TH4-7-5 Zellen.

In beiden chronisch HIV-1 infizierten Zelllinien wurden die Konstrukte für die Expression von hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN transfiziert. Die extra- und intrazelluläre p24 Produktion wurde nach 72 Stunden Expression der einzelnen Proteine mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle diente die Expression von CFP-YFP-N (CYN), da die Proteine hnRNP-A1 und hnRNP-Q jeweils an CYN gekoppelt waren.

Des Weiteren wurde in beiden infizierten Zelllinien untersucht, ob durch die Inhibition der hnRNP-A1 Genexpression mittels spezifischer siRNAs die HIV-1 Replikation beeinflusst wird. Das Protein hnRNP-A1 ist im Bezug auf HIV-1 gut charakterisiert. Es ist bekannt, dass dieses Protein das Spleißen der HIV-1 RNA und den Transport dieser RNA beeinflussen kann. Deshalb wurde dieses Protein für die siRNA Experimente ausgewählt.

Es wurden stets drei unabhängige Experimente durchgeführt. In den Abbildungen 3.22 bis 3.25 ist die p24 Produktion in LC5-HIV und TH4-7-5 nach Expression von CYN bzw. nach Behandlung der Zellen mit Kontroll-siRNAs auf 100 % gesetzt. Die p24-Werte nach Überexpression der beiden Rev-interagierenden Proteine bzw. nach Behandlung der Zellen mit sihnRNP-A1 wurden auf diese bezogen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich die absoluten p24 Mengen in LC5-HIV und TH4-7-5 Zellen deutlich voneinander unterscheiden (Abbildung 3.21).

Der Einfluss von hnRNP-A1-CYN und hnRNP-Q-CYN auf die HIV-1 Replikation in LC5-HIV Zellen ist in Abbildung 3.22 dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle (CYN) ist zu sehen, dass die Expression von hnRNP-A1-CYN die p24 Produktion extra- und intrazellulär um etwa 30 % steigerte. Nach Expression von hnRNP-Q-CYN war sowohl extra- als auch intrazellulär eine Steigerung der p24-Menge um etwa 40 – 50 % zu sehen.

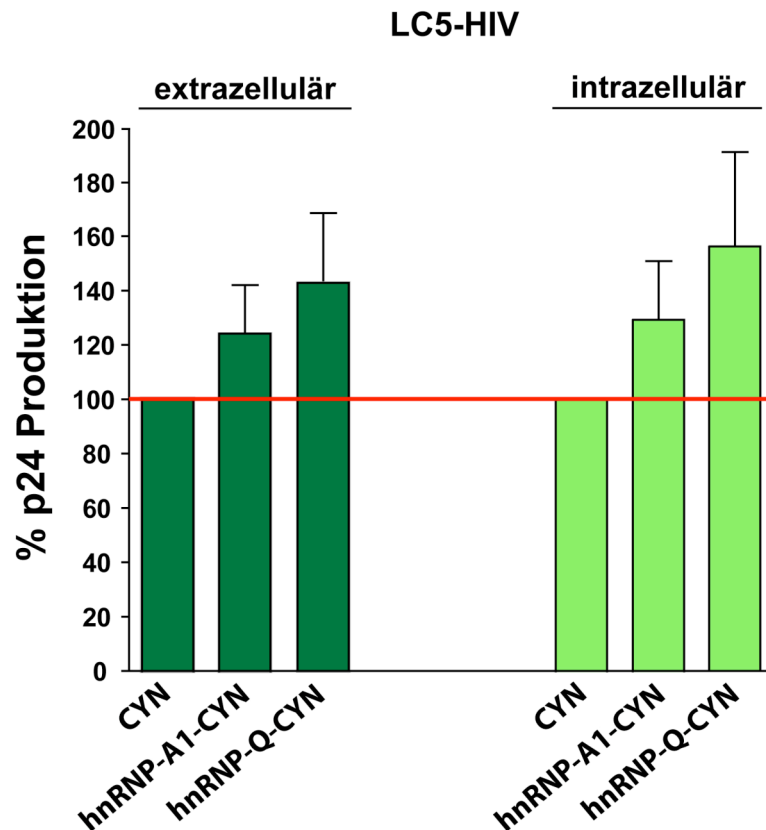


Abbildung 3.22.: Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die HIV-1 Replikation in chronisch infizierten HeLa Zellen (LC5-HIV)

Die Veränderung der HIV-1 Replikation durch hnRNP-A1 bzw. hnRNP-Q wurde durch Bestimmung der p24 Menge im Zellüberstand und in den Zellen nach 72 Stunden ermittelt. Als Kontrolle wurde die Veränderung der p24 Produktion (extra- und intrazellulär) nach CFP-YFP-N (CYN) Expression bestimmt und alle weiteren Daten darauf bezogen. HnRNP-A1-CYN führte in LC5-HIV Zellen sowohl extra- als auch intrazellulär zu einer Erhöhung der p24 Produktion um etwa 30 %. Nach einer hnRNP-Q-CYN Expression konnte eine Steigerung der p24 Produktion (extra- und intrazellulär) um etwa 40 – 50 % beobachtet werden.

Alle Untersuchungen erfolgten in je drei unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 3.23 sind die Ergebnisse der siRNA-Versuche gerichtet gegen hnRNP-A1 in LC5-HIV Zellen dargestellt. Es ist zu sehen, dass eine Verminderung der hnRNP-A1 Genexpression nach siRNA Behandlung die p24 Produktion um etwa 30 – 40 % im Vergleich zur Negativkontrolle senkte (extra- und intrazellulär). Als Negativkontrolle wurde eine „non-silencing“ siRNA eingesetzt, welche zu keiner humanen Genomsequenz komplementär ist. Dadurch sollte diese Kontroll-siRNA keinen Einfluss auf die Genexpression humaner Genprodukte haben. Somit scheint

eine Abnahme der hnRNP-A1 Genexpression durch siRNAs die HIV-1 Replikation negativ zu beeinflussen.

In Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die hnRNP-A1 Expression mit Hilfe von sihnRNP-A1 im Vergleich zur Kontrolle vermindert wurde (Abbildung 3.23).

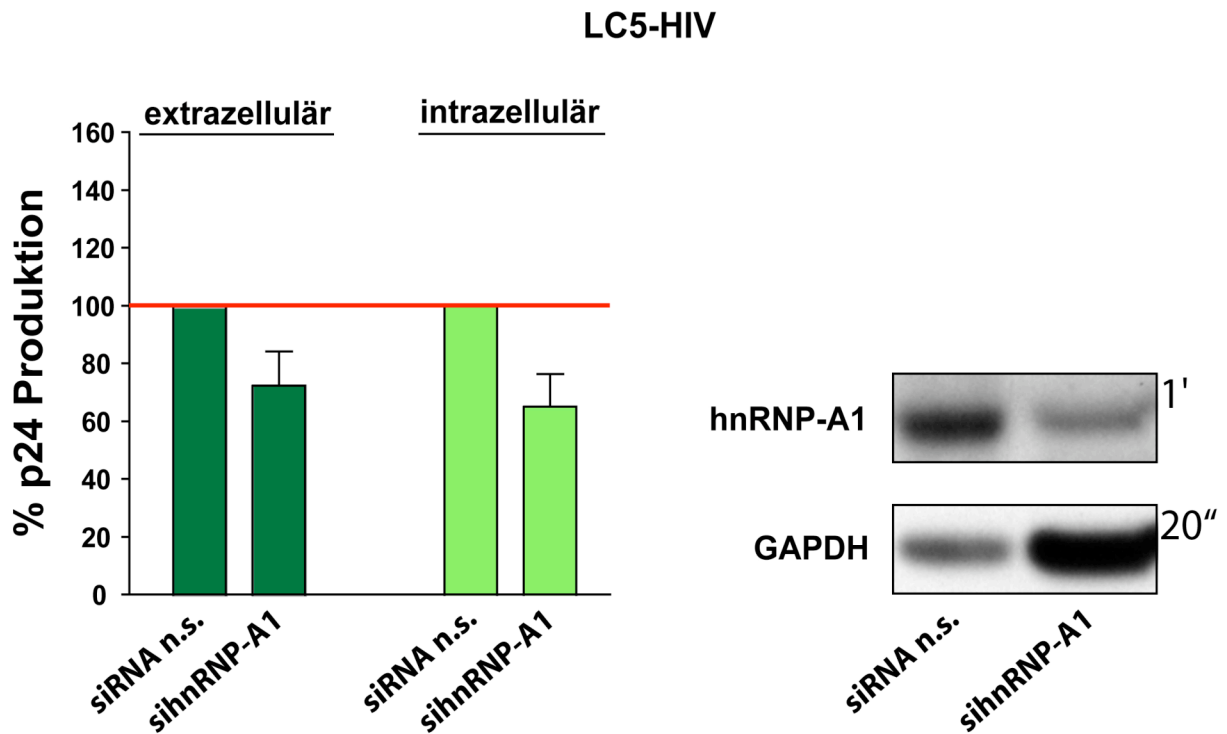


Abbildung 3.23: Einfluss von sihnRNP-A1 auf die HIV-1 Replikation in chronisch infizierten HeLa-Zellen (LC5-HIV)

In RNAi Untersuchungen wurde geschaut, ob sich die p24 Produktion verändert, wenn die hnRNP-A1 Genexpression mittels RNAi inhibiert wird. Als Kontrolle wurde eine non-silencing siRNA eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass die p24 Produktion nach Behandlung mit einer siRNA gegen hnRNP-A1 abnimmt (extra- und intrazellulär). Die hnRNP-A1-Genexpression wurde in sihnRNP-A1-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Dies konnte in Western Blot Analysen ermittelt werden. Die Expositionszeiten sind in der Abbildung angegeben. n.s.: Negativkontrolle („non-silencing“ siRNA) Alle Untersuchungen erfolgten in je drei unabhängigen Experimenten.

In chronisch HIV-1 infizierten Astrozyten (TH4-7-5) hatte das Protein hnRNP-A1-CYN auch eine induzierende Wirkung auf die p24 Produktion. Extra- und intrazellulär stieg die p24 Menge um etwa 30 %. Die hnRNP-Q-CYN Expression in TH4-7-5 Zellen zeigte genauso wie in den LC5-HIV Zellen, im Überstand und im Zelllysat, einen steigernden Effekt von etwa 40 % (Abbildung 3.24).

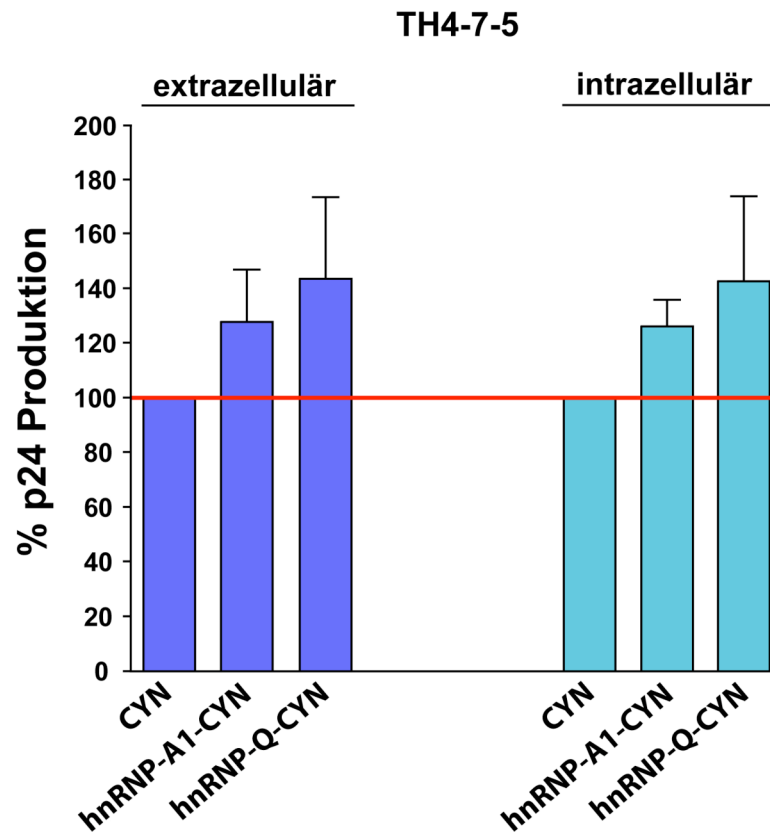


Abbildung 3.24.: Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die HIV-1 Replikation in chronisch infizierten Astrozytomzellen (TH4-7-5)

In TH4-7-5 Zellen wurde die Veränderung der p24 Produktion durch hnRNP-A1 bzw. hnRNP-Q im Zellüberstand und in den Zellen nach 72 Stunden ermittelt. Als Kontrolle wurde CFP-YFP-N (CYN) verwendet (siehe Abbildung 3.22/A). HnRNP-A1-CYN erhöhte in TH4-7-5 Zellen die extra- und intrazelluläre p24 Menge um etwa 30 %. Eine hnRNP-Q-CYN Expression führte zu einer Erhöhung der p24 Produktion um etwa 40 % (extra- und intrazellulär).

Alle Untersuchungen erfolgten in je drei unabhängigen Experimenten.

Die Verminderung der Genexpression von hnRNP-A1 in TH4-7-5 Zellen hatte die gleiche Auswirkung auf die HIV-1 Replikation wie in LC5-HIV Zellen. Es konnte extra- und intrazellulär eine Inhibition der HIV-1 Replikation von etwa 30 % gemessen werden (Abbildung 3.25). Als Negativkontrolle wurde die „non-silencing“ siRNA eingesetzt.

Western Blot Analysen zeigten, dass ebenfalls in Astrozyten die hnRNP-A1 Genexpression nach sihnRNP-A1 Behandlung, im Vergleich zur Kontrolle, abnahm (Abbildung 3.25).

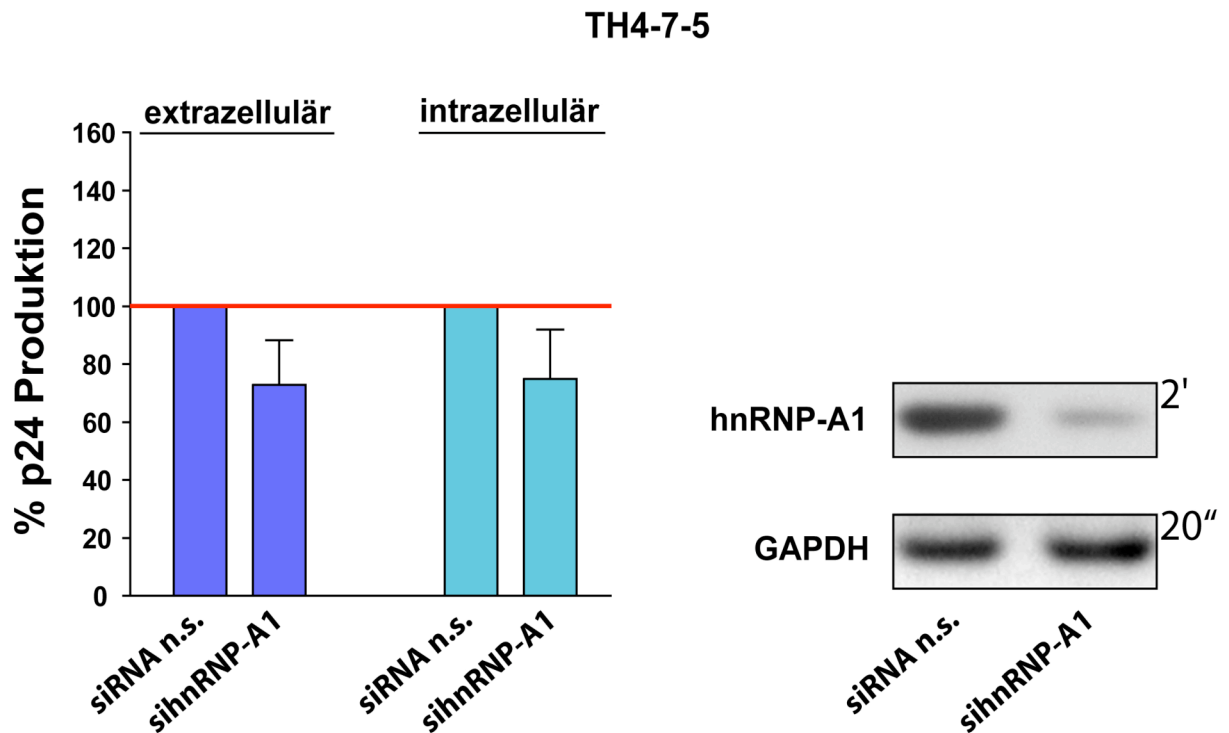


Abbildung 3.25.: Einfluss von sihnRNP-A1 auf die HIV-1 Replikation in chronisch infizierten Astrozytomzellen (TH4-7-5)

Die Inhibition der hnRNP-A1 Genexpression führte in TH4-7-5 Zellen zu einer Reduktion der HIV-1 Replikation im Vergleich zur Kontrolle (non-silencing siRNA). Dies wurde durch die Bestimmung der p24 Produktion (extra- und intrazellulär) ermittelt. Die Analyse der Zelllysate im Western Blot zeigte, dass in sihnRNP-A1-behandelten Zellen das hnRNP-A1-Protein weniger exprimiert wurde.

n.s.: Negativkontrolle („non-silencing“ siRNA)

Alle Untersuchungen erfolgten in je drei unabhängigen Experimenten.

Zusammengefasst kann man sagen, dass hnRNP-A1 und hnRNP-Q die HIV-1 Replikation steigern. Diese Effekte auf die HIV-1 Replikation wurden in diesem Testsystem anhand der p24 Menge gemessen und sind unabhängig von den verwendeten Zelllinien nachweisbar.

3.6. Untersuchung der Interaktion weiterer hnRNP-Proteine mit HIV-1 Rev in Astrozyten

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass zwei hnRNP Proteine (hnRNP-A1 und hnRNP-Q) mit HIV-1 Rev interagieren können und sowohl einen Einfluss auf die Reporterprotein-Produktion als auch auf die HIV-1 Replikation besitzen, wurde im letzten Teil der Arbeit die Interaktion von Rev mit anderen hnRNP-Proteinen untersucht.

Die Elutionsfraktionen der RevGFP-*Strep*TagII, Δ 2-8RevGFP-*Strep*TagII und Δ 2-14RevGFP-*Strep*TagII Affinitätschromatographien, die jeweils mit U138MG-Astrozytomzelllysaten durchgeführt wurden (siehe 3.3.1 und 3.3.5), wurden auf das Vorhandensein von hnRNP-E1, E2, K, R und U untersucht. Im Falle der Proteine hnRNP-E1 und E2 konnte bereits ein Einfluss dieser Proteine auf die Rev Funktion und auf die HIV-1 Replikation gezeigt werden (Woolaway *et al.*, 2007). Die Interaktion dieser beiden hnRNP Proteine mit Rev ist nicht bekannt. Die Primärstruktur der Proteine hnRNP-R und hnRNP-Q stimmen zu etwa 80 % überein. Daher ist die Untersuchung der Interaktion mit Rev mit hnRNP-R von Interesse. Für ein Fragment von hnRNP-U ist bereits ein Einfluss auf die HIV-1 Replikation beschrieben (Valente and Goff, 2006). Eine Interaktion mit Rev wurde ebenfalls noch nicht gezeigt. hnRNP-K ist ein bedeutendes hnRNP Protein mit vielen zellulären Funktionen (Bomsztyk *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass hnRNP-K mit hnRNP-E1 und E2 interagiert (Kim *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2007).

Die Proteine hnRNP-K, R und U konnten in den Elutionsfraktionen der RevGFP-*Strep*TagII und Δ 2-8RevGFP-*Strep*TagII detektiert werden, in der Δ 2-14RevGFP-*Strep*TagII Elutionsfraktion waren diese jedoch kaum detektierbar (Abbildung 3.26). Die Untersuchung der U138MG-Zelllysate zeigte, dass die drei analysierten hnRNP Proteine in allen drei untersuchten Zelllysaten nachweisbar waren.

Demnach konnte gezeigt werden, dass die hnRNP Proteine hnRNP-K, R und U mit der N-terminalen Domäne von Rev interagieren.

Des Weiteren konnten in allen drei Elutionsfraktionen (RevGFP-*Strep*TagII, Δ 2-8RevGFP-*Strep*TagII und Δ 2-14RevGFP-*Strep*TagII Reinigung) die hnRNP Proteine hnRNP-E1 und E2 nachgewiesen werden (Abbildung 3.26). Diese beiden Proteine konnten auch in den eingesetzten U138MG-Zelllysaten aller Affinitäts-

chromatographien mittels Western Blot Analyse detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die beiden hnRNP Proteine hnRNP-E1 und E2 mit Rev interagieren und dabei nicht nur an die N-terminalen 14 Aminosäuren von Rev binden.

Als Positivkontrolle wurde erneut mit einem α Casein Kinase 2 Antikörper untersucht, ob dieses Protein in den Elutionsfraktionen der drei Affinitätschromatographien detektierbar war. Casein Kinase 2 interagierte mit allen drei RevGFP-Varianten (Abbildung 3.26). In den parallel analysierten GFP-*Strep*TagII Elutionsfraktionen wurde keines der untersuchten Proteine nachgewiesen (Abbildung 3.26).

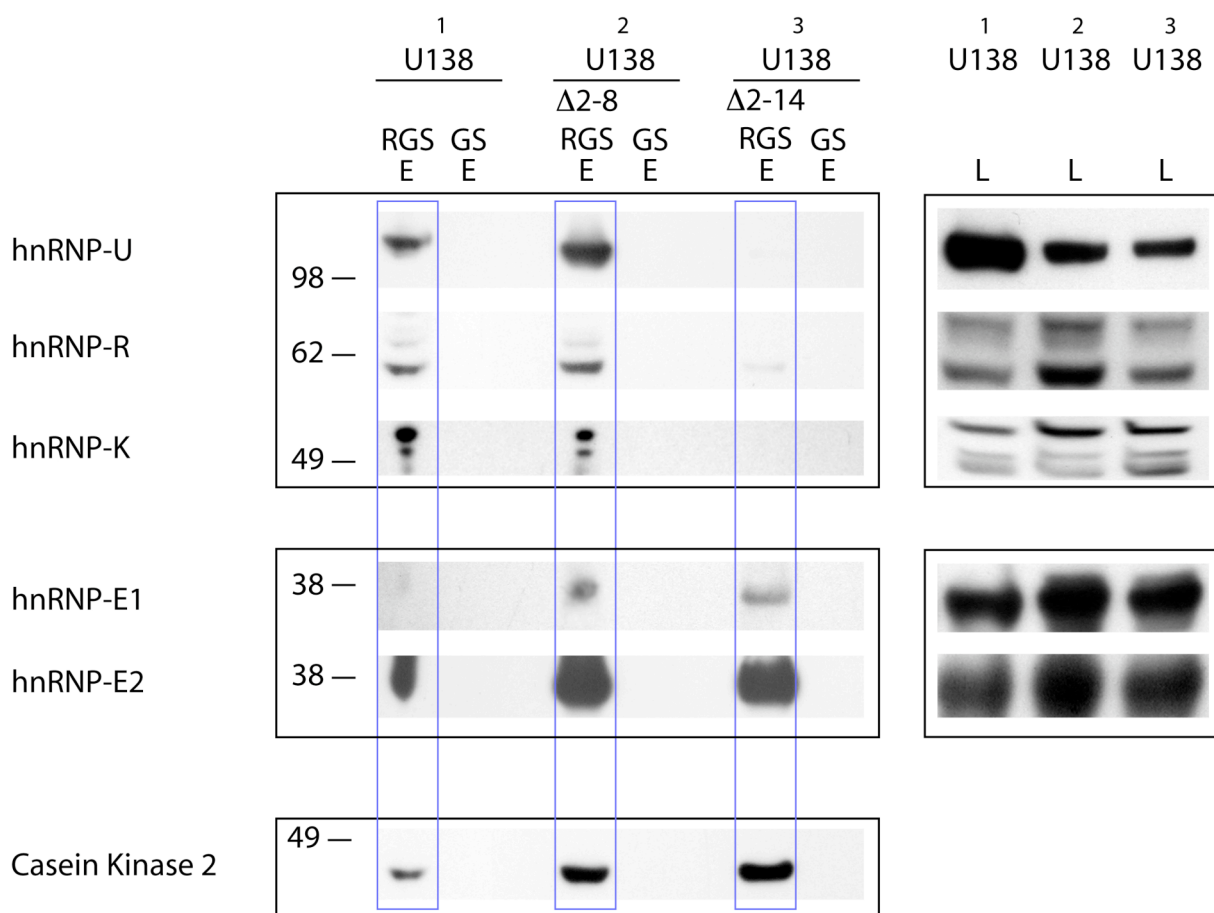


Abbildung 3.26.: Untersuchung der Interaktion von weiteren hnRNP Proteinen mit Rev

Dargestellt sind die Elutionsfraktionen (E) aus den U138MG-Affinitätschromatographien durchgeführt mit RevGFP-*Strep*TagII (RGS), Δ 2-8RevGFP-*Strep*TagII und Δ 2-14RevGFP-*Strep*TagII. Als Kontrolle wurde jeweils eine Reinigung mit GFP-*Strep*TagII durchgeführt.

Fünf hnRNP Proteine (hnRNP-E1, E2, K, R und U) wurden mittels Western Blot Analyse im Hinblick auf die Interaktion mit Rev untersucht. Die hnRNP Proteine hnRNP-K, R und U interagierten mit Wildtyp-Rev und Δ 2-8RevGFP-*Strep*TagII. Eine Interaktion mit Δ 2-14RevGFP-*Strep*TagII konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. hnRNP-E1 und E2 interagierten mit Wildtyp-Rev und den beiden Rev-Deletionsmutanten. Als Positivkontrolle wurde das Rev-interagierende Protein Casein Kinase 2 gewählt. Dieses Protein interagiert mit Wildtyp-Rev und den beiden Rev-Deletionsmutanten in den untersuchten Western Blots.

Alle fünf hnRNP-Proteine waren in den drei Zelllysaten der drei Affinitätschromatographien detektierbar.

Die Interaktion von Rev mit hnRNP-R und U wurde mit Hilfe einer zweiten Methode, der Immunpräzipitation, überprüft. Die Bindung von Rev an hnRNP-K konnte nicht mit der Immunpräzipitation untersucht werden, da der Primärantikörper gegen hnRNP-K aus der gleichen Spezies stammte, wie der verwendete Kaninchen-Präzipitationsantikörper. Die Proteine hnRNP-E1 und E2 konnten ebenfalls nicht mittels Immunpräzipitation untersucht werden, da die verwendeten Primärantikörper kein ausreichendes Signal in den Western-Blot Analysen der Immunpräzipitationen erzielten.

Mittels Immunpräzipitation mit einem Kaninchen- α GFP-Antikörper und U138-RevGFP-*Strep*TagII bzw. HeLa-pHit-RevGFP(α -Klon) Zalllysaten wurde die Interaktion der hnRNP-Proteine hnRNP-R und U mit Rev verifiziert. Als Kontrolle für unspezifische Interaktionen wurde jeweils eine Immunpräzipitation mit den U138-GFP-*Strep*TagII Zellen bzw. den HeLa-GFP-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Lysate und Präzipitate der Immunpräzipitationen wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörperfärbung auf das Vorhandensein von hnRNP-R und U analysiert.

In Abbildung 3.27 ist zu sehen, dass die Proteine hnRNP-R und U aus Astrozyten (U138MG) in der Immunpräzipitation zusammen mit RevGFP-*Strep*TagII co-präzipitiert wurden, mit GFP-*Strep*TagII jedoch nicht. Dies deutet auf eine spezifische Interaktion von hnRNP-R und U mit HIV-1 Rev in Astrozyten hin.

Die Interaktion von Rev mit hnRNP-R bzw. U konnte ebenfalls in HeLa-Zellen gezeigt werden. In diesen Experimenten war eine leicht unspezifische Bindung von hnRNP-R und U an GFP zu sehen. Diese war jedoch sehr viel schwächer als die Interaktion mit RevGFP (Abbildung 3.27).

Die effiziente Präzipitation der Proteine RevGFP-*Strep*TagII und GFP-*Strep*TagII (Astrozyten) bzw. RevGFP und GFP (HeLa-Zellen) konnten in Western Blot Analysen mit einem Ratte- α GFP-Antikörper gezeigt werden. Diese Proteine waren in den Präzipitaten (P) nachweisbar (Abbildung 3.27). Dies stellte die Positivkontrolle für die Immunpräzipitation dar.

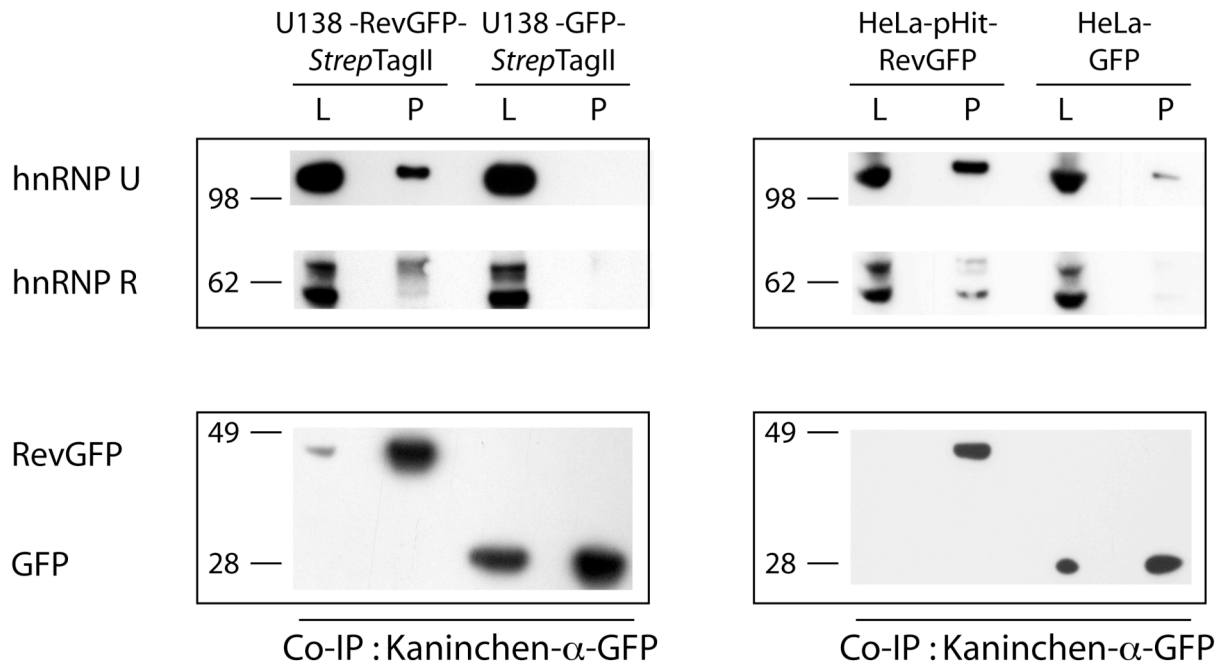


Abbildung 3.27.: Co-Immunpräzipitation von hnRNP-R und U zusammen mit Rev in Astrozyten und HeLa-Zellen

Die Immunpräzipitation von RevGFP-*StrepTagII* (Astrozyten) bzw. RevGFP (HeLa-Zellen) erfolgte mit einem Kaninchen- α GFP-Antikörper. Als Negativkontrolle wurde je eine Immunpräzipitation mit GFP-*StrepTagII* (Astrozyten) bzw. GFP (HeLa-Zellen) durchgeführt.

Die Proteine hnRNP-R und U konnten sowohl in Astrozyten als auch in HeLa-Zellen spezifisch mit Rev co-präzipitiert werden. Diese Proteine sind in den Präzipitaten (P) der RevGFP Immunpräzipitationen vorhanden, in den GFP Präzipitaten aber nicht oder nur sehr leicht.

Die Proteine RevGFP bzw. GFP konnten in beiden Zelllinien effizient präzipitiert werden. Diese sind in den entsprechenden Präzipitaten nachweisbar.

Mittels Immunpräzipitation konnte somit die Bindung von Rev an hnRNP-R und U in Astrozyten verifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese beiden hnRNP-Proteine auch in HeLa-Zellen mit Rev interagieren.

4. Diskussion

4.1. *Strep*TagII-Affinitätschromatographie eignet sich für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro*

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie ist es möglich, gesamte Proteinkomplexe zu identifizieren. Es gibt verschiedene Affinitäts-Tags, die für Affinitätsreinigungen eingesetzt werden (Lichty *et al.*, 2005; Terpe, 2003). In den letzten Jahren haben sich die Tags *Strep*TagII (Schmidt and Skerra, 2007), FLAG-Tag (Einhauer and Jungbauer, 2001) und so genannte TAP-Tags (Tandem purification Tags) (Gloeckner *et al.*, 2007; Puig *et al.*, 2001) durchgesetzt. Für die Isolierung von Rev-Protein-Komplexen aus Astrozyten wurde in dieser Arbeit das *Strep*TagII ausgewählt. Es besitzt ein deutlich geringeres Molekulargewicht als das TAP-Tag. Außerdem bestand praktische Erfahrungen mit dem *Strep*TagII (Schlapschy *et al.*, 2004). Daher wurde es dem ebenso kleinen FLAG-Tag vorgezogen.

Affinitätsreinigungen können entweder nach Expression des getaggen Proteins in eukaryotischen Zellen (*in cyto*) oder mit bakteriell hergestellten Proteinen, welche das Tag enthalten, und Zelllysaten (*in vitro*) durchgeführt werden.

Die Isolierung von Rev-assoziierten Proteinen nach Überexpression von RevGFP-*Strep*TagII in Astrozyten wurde ebenfalls in dieser Arbeit analysiert (Daten nicht gezeigt). Mit diesem Ansatz war es jedoch kaum möglich Rev-interagierende Faktoren zu isolieren. Daher wurden Rev-interagierende Faktoren *in vitro* mit bakteriellem RevGFP-*Strep*TagII und Astrozytenzelllysaten analysiert. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass eine große Menge an „Bait“-Protein für die Affinitätschromatographie eingesetzt wird und somit die Bindungsstellen der Affinitätschromatographie-Säulen weitgehend abgesättigt werden. Dadurch können auch dynamische Protein-Protein-Interaktionen an der Rev-gekoppelten Säule untersucht werden. Der Nachteil dieses Ansatzes ist, dass die „Bait“-Proteine in Bakterien hergestellt werden und somit keine für eukaryotische Zellen relevanten posttranslationalen Modifikationen besitzen. Diese Modifikationen sind jedoch häufig wichtig für die Ausbildung oder Verhinderung von Protein-Protein-Interaktionen (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006; Seet *et al.*, 2006). Außerdem können bei *in vitro* Bindungsstudien Interaktionen zwischen Proteinen, die in der Zelle nicht in gleichen Kompartimenten vorliegen, entstehen. Solche Interaktionen würden nicht einer physiologischen Interaktion entsprechen.

Um nachzuweisen, ob diese Methode für die Isolierung von Rev-interagierenden Faktoren geeignet ist, wurde die spezifische Co-Elution von bekannten Rev-interagierenden Faktoren untersucht. Hierbei wurden die Proteine B23, Casein Kinase 2, CRM1, eIF-5A und Importin- β analysiert (siehe Abschnitt 10.2, Tabelle 10.1). Alle fünf Proteine aus U138- und 85HG66-Astrozytom Zellen interagierten spezifisch mit dem Rev-Protein. Eine Bindung dieser Proteine an GFP-*StrepTagII* war nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis bestätigt, dass es mit diesem Ansatz möglich ist, mehrere Rev-interagierende Proteine aus humanen Zellen zu isolieren. In den Reinigungen gab es auch zelluläre Proteine, die nicht mit dem Rev-Protein interagierten. Die Proteine GAPDH und RNA-Polymerase II konnten weder in den RevGFP-*StrepTagII* noch in den GFP-*StrepTagII* Elutionsfraktionen detektiert werden. Dies zeigt, dass in diesem System nicht alle zellulären Proteine mit dem Rev-Protein interagieren.

In dieser Arbeit konnte bei den Rev-Interaktionsstudien zum ersten Mal eine Bindung des Rev-Proteins an zellulär exprimiertes Casein Kinase 2, eIF-5A bzw. Importin- β aus humanen Zelllysaten gezeigt werden.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal die Interaktion der Proteine B23, Casein Kinase 2, CRM1, eIF-5A und Importin- β mit dem Rev-Protein in Astrozyten gezeigt werden.

4.2. Untersuchung von Rev-interagierenden Faktoren mit bakteriell hergestelltem RevGFP-*StrepTagII* und humanen Astrozytenzelllysaten

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Fusion des GFP-Proteins an das Rev-Protein keinen Einfluss auf die Rev-Aktivität hat (Ludwig *et al.*, 1999; Stauber *et al.*, 1995). Deshalb wurden die Untersuchungen in dieser Arbeit mit *StrepTagII*-gekoppeltem RevGFP durchgeführt. Es wurde RevGFP gewählt, da das GFP die Beobachtung des „Bait“-Proteins bei der Affinitätschromatographie anhand der Grün-Fluoreszenz erlaubt. Zudem kann das GFP als „Spacer“ zwischen dem Rev und dem *StrepTagII* dienen, sodass Rev-interagierende Faktoren das „Tag“ nicht überlagern und die Reinigung nicht behindern können.

Als Kontrolle für unspezifische Interaktionspartner bei den Reinigungen mit RevGFP-*StrepTagII* wurde das GFP-*StrepTagII* verwendet. Mit Hilfe dieser Kontrolle ist es möglich, Proteine, die unspezifisch mit GFP, mit dem *StrepTagII* bzw. mit der Säule interagieren, zu bestimmen.

In einer Kollaboration mit dem Institut für medizinische Physik und Biophysik in Münster (CeNTech) wird die Exportfunktion des rekombinant hergestellten RevGFP-*StrepTagII* getestet. Erste Untersuchungen zeigten einen spezifischen RNA-Export von RRE-haltiger RNA durch RevGFP-*StrepTagII* zusammen mit CRM1 und RanGTP (Viola Baumgärtel, unveröffentlichte Daten). Diese vorläufigen Daten weisen darauf hin, dass in Bakterien hergestelltes RevGFP-*StrepTagII* in der Lage ist den RNA-Export zu vermitteln. Diese Daten müssen jedoch zusammen mit weiteren Kontrollen verifiziert werden.

4.2.1. Das bakteriell hergestellte Rev-Protein interagiert mit PABP1 bzw. Nucleolin, PARP1, Histon H2A und NAP1L1, die mit dem Chromatin in Zusammenhang stehen

In den Affinitätsreinigungen konnten fünf Rev-interagierende Proteine (PABP1, Nucleolin, PARP1, Histon H2A und NAP1L1) identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.3.1 und Abbildung 3.5 und 3.6). Das Protein PABP1 (Poly-A binding protein 1) konnte nur sehr schwach im Präzipitat der U138-RevGFP-*StrepTagII* nach Co-IP nachgewiesen werden. Daher könnte diese Interaktion mit Rev unspezifisch sein. Die Proteine PARP1 (Poly (ADP-ribose) polymerase-1) und Nucleolin waren nach Co-IP in den Präzipitaten nicht nachweisbar. Im Falle der Proteine Histon H2A und NAP1L1 (Nucleosome assembly protein 1 like 1) war die Untersuchung mittels Co-IP nicht möglich, da die Primärantikörper für Western Blot Analysen gegen beide Proteine aus dem Kaninchen stammten. Der α -GFP-Präzipitationsantikörper stammt ebenfalls aus dem Kaninchen. Nachdem dieser Antikörper aus dem Präzipitat nicht entfernt wird, kommt es bei der Western Blot Analyse zu Kreuzreaktionen zwischen dem α -Kaninchen-Sekundärantikörper und dem Präzipitationsantikörper.

In den Affinitätsreinigungen waren geringe Mengen an Nucleolin bzw. Histon H2A in den Elutionsfraktionen der GFP-*StrepTagII* Reinigung zu sehen. Dies würde für eine unspezifische Interaktion dieser beiden Proteine mit RevGFP-*StrepTagII* sprechen.

Die Interaktion der fünf genannten Proteine mit Rev sollte mittels einer anderen Methode verifiziert werden. Denn alle fünf Proteine werden in der Literatur mit HIV-1, HIV-1 Rev oder zellulären Rev-interagierenden Proteinen in Zusammenhang gebracht. Im Folgenden sollen einige dieser Zusammenhänge diskutiert werden.

PABP1 ist ein multifunktionelles Protein, das an der mRNA Reifung, Stabilisierung und Translationsinitiation, beim Schutz der RNA vor Abbau der CAP- bzw. poly(A)-Sequenz und bei vielen weiteren Prozessen beteiligt ist (Afonina *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass PABP1 an die INS1 in der p17gag-Region bindet. Die Autoren vermuteten eine Inhibition der Gag Produktion infolge dieser Bindung (Afonina *et al.*, 1997). Die Interaktion von PABP1 mit der p17gag-Region könnte der Grund für die INS-vermittelte Inhibition der HIV-1 Genexpression sein. Durch die Interaktion von Rev mit PABP1 (gezeigt in dieser Arbeit) könnte Rev der PABP1-p17gag Bindung und dadurch der Inhibition der Genexpression entgegenwirken.

Nucleolin ist ein RNA-bindendes Protein und besitzt RRM-Domänen (siehe auch bei hnRNP-A1, Q und R). Es lokalisiert stark in den Nukleoli und besitzt viele Funktionen in der Zelle, wie z.B. rRNA Biogenese und Reifung, Ribosomenzusammenbau, Nukleo-zytoplasmatischer Transport und „Remodelling“ von Nucleosomen (Angelov *et al.*, 2006; Ginisty *et al.*, 1999; Mongelard and Bouvet, 2007). Diese grundlegenden zellulären Prozesse sind auch an der HIV-1 Genexpression beteiligt. Das Protein

PARP1 hat ebenfalls sehr viele zelluläre Funktionen, wie z.B. poly(ADP-Ribosylierung) von Histonen, Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen, Beteiligung am DNA-Reparaturmechanismus, Ko-Aktivierung von NF- κ B, Beteiligung an der Degradation von Proteinen und an der Apoptose (zusammengefasst in (Virag and Szabo, 2002)). In Zusammenhang mit HIV-1 konnte gezeigt werden, dass PARP-1 die HIV-1 Transkription negativ beeinflusst, indem es an die TAR-Region in der LTR bindet und somit die Tat Bindung inhibiert (Parent *et al.*, 2005). **Histon H2A**

ist Teil des Nucleosomenkomplexes (Quina *et al.*, 2006) und es ist bekannt, dass die HIV-1 5'-LTR zwei Nucleosomen (Nuc-0 und Nuc-1) bindet (He and Margolis, 2002). Das Protein **NAP1L1** gehört zur Familie der Nucleosome Assembly Proteine (NAP). Die Proteine dieser Familie sind Histon Chaperone und beteiligt an der Nucleosomen Remodelierung, an Histon Modifikationen, an der Transkription und weiteren zellulären Prozessen (Park and Luger, 2006; Zlatanova *et al.*, 2007). Vor kurzem konnte eine Interaktion zwischen HIV-1 Tat und NAP-1 gezeigt werden. Hierbei

konnte eine positive Regulation der Tat-vermittelten Reporterfunktion durch NAP-1 nachgewiesen werden (Vardabasso *et al.*, 2008).

Wenn man die Funktionen der Proteine Nucleolin, PARP1, Histon H2A und NAP1L1 betrachtet, wird deutlich, dass die Gemeinsamkeit dieser Proteine in Ihrem Zusammenhang mit dem Chromatin bzw. dem „Remodelling“ und der Modifizierung von Nucleosomen liegt. Innerhalb dieser Proteingruppe sind auch Interaktionen zwischen Nucleolin und PARP1 (Borggreffe *et al.*, 1998) bzw. zwischen Nucleolin und H2A-H2B Dimeren bekannt (Angelov *et al.*, 2006). Zudem konnte in Immunpräzipitationsanalysen eine Interaktion der Proteine PARP1 und Histon H2A mit einem Protein mit der Rev-interagierenden Risp-Domäne (Fam21c) gezeigt werden (Vincendeau, HelmholtzZentrum München, unveröffentlichte Daten) (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005a).

In Abbildung 4.1 ist ein Interaktionsnetzwerk für die Proteine Rev, Nucleolin, PARP1, Histon H2A und NAP1L1 und einem Risp-haltigen Protein (Fam21c) dargestellt.

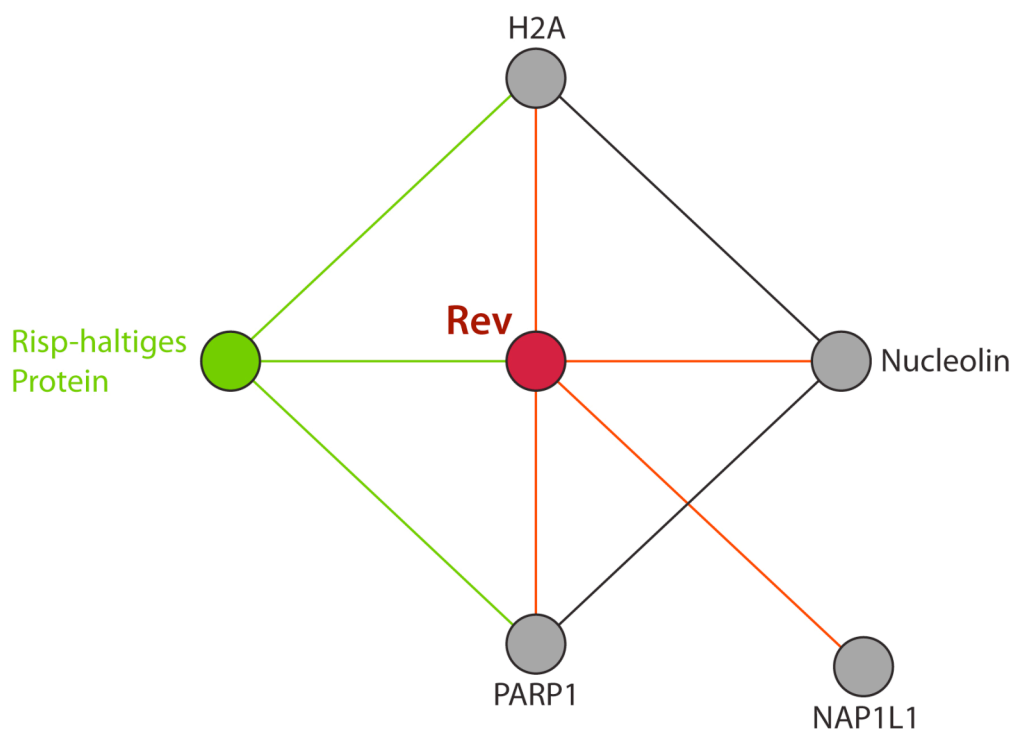


Abbildung 4.1. Interaktionsnetzwerk von Rev mit Chromatin-assoziierten Proteinen und einem Risp-haltigen Protein (Fam21c)

Rote Linien zeigen Interaktionen, die in dieser Arbeit identifiziert wurden. Schwarze Linien symbolisieren Interaktionen, die aus der Literatur bekannt sind und grüne Linien zeigen Interaktionen aus unveröffentlichten Arbeiten (Vincendeau, HelmholtzZentrum München).

Folglich ist hier ein Netzwerk an Interaktionspartnern vorhanden, die HIV-1 Rev und ein Risp-haltiges Protein (Fam21c) in Zusammenhang mit dem Nucleosomen „Remodelling“ und der Modifizierung von Nucleosomen bringen. Nachdem Rev für den Transport und die Translation Intron-haltiger RNA-Moleküle zuständig ist und Tat die Transkription der viralen RNA steuert (Cullen, 1998a), stellt sich die Frage nach der Funktion des Rev Proteins in Bezug auf das Nucleosomen „Remodelling“ und die Modifizierung von Nucleosomen.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Tat nicht nur die Transkription LTR-gesteuerter RNA-Moleküle reguliert, sondern auch das Spleißen dieser RNA-Moleküle indirekt beeinflussen kann. Gründe, die hierfür diskutiert wurden, waren zum einen die Tat-vermittelte Induktion der Transkription durch RNA-Polymerase II, wodurch die Transkriptmenge erhöht wird und zum anderen die Rekrutierung einiger Spleiß-Aktivatoren und Inhibitoren durch das Tat-Protein ((Ziegler, 2006), Veröffentlichung in Arbeit). Im Falle von Rev könnte man spekulieren, dass es bei der HIV-1 Replikation noch weitere Aufgaben im Bezug auf die DNA und der damit verbundenen Nucleosomen besitzen könnte.

4.2.2. Die RNA-Bindungsproteine hnRNP-A1, E1, E2, K, Q, R und U interagieren mit HIV-1 Rev

In einer vorangegangenen Arbeit konnte die Interaktion von hnRNP-A1 und Q aus Astrozytenzelllysaten mit einem Peptid bestehend aus den ersten 14 Aminosäuren von Rev gezeigt werden. Diese Interaktionen wurden jedoch nicht verifiziert (Mäusbacher, 2006).

Mit unterschiedlichen Methoden (Affinitätschromatographie, Co-Immunpräzipitation und exBIFC) wurde in dieser Arbeit die Interaktion von hnRNP-Proteinen (hnRNP-A1, E1, E2, K, Q, R und U) mit dem Rev-Protein und zwei N-terminal, deletierten Rev-Mutanten in Astrozyten analysiert. Zusätzlich wurde die Interaktion einiger Proteine in HeLa-Zellen untersucht. Tabelle 4.1 zeigt eine Zusammenfassung aller Interaktionsanalysen mit den Rev-Proteinvarianten und den genannten hnRNP-Proteinen. In dieser Tabelle sind auch die Methoden, mit denen eine Interaktion detektiert oder nicht detektiert wurde, dargestellt. Des Weiteren sind die Ergebnisse der Peptid-Analyse (Mäusbacher, 2006) zum Vergleich aufgeführt.

Die Proteine hnRNP-A1, Q, R, U und K interagierten in Astrozyten mit dem vollständigen Rev-Protein und der $\Delta 2-8$ Rev-Deletionsmutante, aber nicht mit der $\Delta 2-14$ Rev-Deletionsmutante. Dieses Ergebnis zeigt, dass diese Proteine in Astrozyten mit dem Aminoterminus von Rev interagieren. Im Gegensatz dazu konnte im Falle der hnRNP-Proteine E1 und E2 eine Interaktion mit allen drei Rev-Proteinvarianten (Rev, $\Delta 2-8$ Rev und $\Delta 2-14$ Rev) nachgewiesen werden. Eine Interaktion der Proteine hnRNP-E1 und E2 mit dem N-Terminus von Rev kann nicht ausgeschlossen werden. Das Ergebnis zeigt jedoch, dass diese beiden Proteine auch mit anderen Bereichen von Rev interagieren können.

Die Interaktionsuntersuchungen in HeLa-Zellen zeigten, dass die Proteine hnRNP-Q, R und U auch in HeLa-Zellen an Rev binden. Das Protein hnRNP-A1 interagierte hingegen nicht mit Rev in HeLa-Zellen. Somit war hier eine zelltypabhängige Interaktion eines hnRNP-Proteins mit Rev nachweisbar.

Mit den Proteinen hnRNP-K, E1 und E2 konnten aus technischen Gründen keine Interaktionsanalysen mit Rev in HeLa-Zellen durchgeführt werden. Die Primärantikörper gegen hnRNP-E1, E2 und K eigneten sich nicht für die Western Blot Analyse nach der Co-Immünpräzipitationen. Die Antikörper gegen hnRNP-E1 und E2 waren nicht sensitiv genug, um ausreichende Signale in den Western Blot Analysen zu erzeugen. Der Primärantikörper gegen hnRNP-K war aus der gleichen Spezies wie der Präzipitationsantikörper, wodurch es zu Kreuzreaktionen bei der Western Blot Analyse kam.

Mit diesen Ergebnissen konnten die Daten der Interaktionsuntersuchung mit dem Rev(1-14)-Peptid und den Proteinen hnRNP-A1 und Q verifiziert werden. Darüber hinaus konnten fünf weitere hnRNP-Proteine (hnRNP-E1, E2, K, R und U) identifiziert werden, die zum Teil domänenspezifisch (N-Terminus des Rev-Proteins) mit dem Rev-Protein interagierten. Eine zelltypabhängige Interaktion von hnRNP-A1 mit dem Rev-Protein konnte zudem nachgewiesen werden.

RevGFP-Variante	RevGFP- <i>Strep</i> TagII		Δ 2-8RevGFP- <i>Strep</i> TagII	Δ 2-14RevGFP- <i>Strep</i> TagII	1-14 Peptid
Zelllinie	Astrozyten U138 + 85HG66	HeLa	Astrozyten U138	Astrozyten U138	Astrozyten U138 +85HG66
hnRNP-A1	ja (AC + IP)	nein (AC + exBIFC)	ja (AC)	nein (AC)	ja
hnRNP-Q	ja (AC + IP)	ja (AC + exBIFC)	ja (AC)	nein (AC)	ja
hnRNP-R	ja (AC + IP)	ja (IP)	ja (AC)	nein (AC)	n.u.
hnRNP-U	ja (AC + IP)	ja (IP)	ja (AC)	nein (AC)	n.u.
hnRNP-K	ja (AC)	n.u.	ja (AC)	nein (AC)	n.u.
hnRNP-E1	ja (AC)	n.u.	ja (AC)	ja (AC)	n.u.
hnRNP-E2	ja (AC)	n.u.	ja (AC)	ja (AC)	n.u.

Tabelle 4.1.: Interaktionsuntersuchungen mit verschiedenen Rev-Varianten

Zusammenfassung der Interaktionen der hnRNP-Proteine A1, Q, R, U, K, E1 und E2 mit den Rev-Varianten RevGFP-*Strep*TagII, Δ 2-8RevGFP-*Strep*TagII und Δ 2-14RevGFP-*Strep*TagII in den angegebenen Zelllinien. Die jeweilige Methode, mit der die Interaktion untersucht wurde, ist in der Tabelle angegeben. Zudem ist das Ergebnis der Interaktionsstudie mit einem N-terminalen Peptid (Aminosäuren 1-14 des Rev-Proteins) dargestellt (Mäusbacher, 2006).

AC = Affinitätschromatographie, IP = Immunpräzipitation, n.u. = nicht untersucht.

Im Folgenden werden Details zu den einzelnen hnRNP-Proteinen und bekannte Zusammenhänge im Bezug auf HIV-1 beschrieben.

Das Protein **hnRNP-A1** hat mehrere Funktionen in der eukaryotischen Zelle. Die zwei wichtigsten Funktionen sind die Beteiligung am mRNA Spleißen und am mRNA Export (Dreyfuss *et al.*, 2002). Es unterstützt alternatives Spleißen und ist hierbei oft ein Gegenspieler zu SR Proteinen (z.B. SF2/ASF) (Mayeda and Krainer, 1992; Pollard *et al.*, 2002). Des Weiteren kann hnRNP-A1 die IRES-vermittelte Translation sowohl positiv (Bonnal *et al.*, 2005), als auch negativ (Lewis *et al.*, 2007) beeinflussen. HnRNP-A1 (etwa 40 kDa) besitzt 2 RRM-Domänen (RNA-bindende Motive) in der ersten Hälfte seiner Primärstruktur, in der zweiten Hälfte befinden sich RGG-Wiederholungen. Diese Wiederholungen sind an der RNA Bindung beteiligt. In

dieser Region werden vier Argininseitenketten (R193, R205, R217 und R224) dimethyliert. Die Methylierung beeinflusst die RNA-Bindungsseigenschaften der RGG-Wiederholungen. hnRNP-A1 ist in der Lage, zwischen Zellkern und dem Zytoplasma mit Hilfe der M9-Shuttelsequenz (As 268-305) zu „shutteln“. Die „steady-state“ Lokalisation des Proteins liegt jedoch im Zellkern. Unter normalen Zellbedingungen wird hnRNP-A1 mit Hilfe von Transportin in den Kern transportiert (Allemand *et al.*, 2005; Reed and Hurt, 2002). Bei Zellstress wird das F-Peptid (As 301-319) von hnRNP-A1 durch Casein Kinase II und Protein Kinase A (PKA) mehrfach phosphoryliert. Diese Hyperphosphorylierung inhibiert die Interaktion von A1 mit Transportin. Dadurch kommt es zu einer zytoplasmatischen Akkumulation (Allemand *et al.*, 2005; Hagiwara, 2005). Das Protein hnRNP-A1 kann Homodimere ausbilden. Für die Proteine hnRNP-C1, E2, I, K und L konnte keine Interaktion mit hnRNP-A1 gezeigt werden (Kim *et al.*, 2000).

In Zusammenhang mit HIV-1 gibt es viele Untersuchungen, die hnRNP-A1 als einen „Splicing silencer“ beschreiben (zusammengefasst in (Stoltzfus and Madsen, 2006)). Hierbei bindet hnRNP-A1 an die „exon splicing silencer“ Bereiche ESSV im vpr exon, ESS2 im tat exon 2, ESS3 im tat exon 3 und an den „intron splicing silencer“ Bereich ISS im Intron zwischen tat exon 2 und 3. Durch diese Bindungen inhibiert hnRNP-A1 das Spleißen der viralen RNA (Stoltzfus and Madsen, 2006).

Neben hnRNP-A1 bindet auch hnRNP-H an eine ESS-Region im tat exon 2 (ESS2p) und inhibiert das Spleißen (Jacquet *et al.*, 2001).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass hnRNP-A1 den Export Intron-haltiger RNA-Moleküle eines Reporter-Konstrukts induziert. Hierbei band es an das 5'-Ende der p17INSgag-Region und erhöhte die Transportrate intron-haltiger RNA im Zusammenspiel mit dem Rev-Protein. Dies führte zu einer erhöhten Menge an zytoplasmatischer Reporter-RNA (Najera *et al.*, 1999).

Die Proteine **hnRNP-Q** (alternative Benennung: NSAP1, Gry-rbp oder SYNCRIP) und **hnRNP-R** sind in ihrer Proteinsequenz zu etwa 83 % homolog (Mizutani *et al.*, 2000). Das hnRNP-Q Protein liegt in drei verschiedenen Isoformen (Q1, Q2 und Q3) in der Zelle vor. Diese Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen vom selben Genort. hnRNP-Q3 ist die vollständige hnRNP-Q-Variante, welche aus 623 Aminosäuren aufgebaut ist. Diese Variante wurde in dieser Arbeit verwendet. Die Proteine

hnRNP-Q und R besitzen jeweils drei RRM-RNA-Bindungsdomänen, zwei NLS-Regionen und eine Domäne mit RGG-Wiederholungen (Mourelatos *et al.*, 2001). HnRNP-Q wurde als eine stabile Komponente des Spleißosoms identifiziert (Neubauer *et al.*, 1998). *In vitro* Studien zeigten, dass hnRNP-Q und R für das effiziente prä-mRNA Spleißen notwendig sind. Sie interagierten mit der prä-mRNA und mit Intron-haltigen mRNA-Intermediaten (Mourelatos *et al.*, 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass hnRNP-Q die HCV mRNA binden konnte und dadurch die IRES-vermittelte Translation erhöhte. Somit scheint hnRNP-Q auch die Translation zu beeinflussen (Kim *et al.*, 2004). HnRNP-Q kann mCRD (major protein-coding-region determinant of instability) enthaltende *c-fos* mRNA-Moleküle als Teil eines Multiproteinkomplexes stabilisieren und somit die Deadenylierung und den Abbau der mRNA verhindern. Dadurch wird die Translationsrate der mRNA erhöht (Grosset *et al.*, 2000). In einer anderen Studie konnte hingegen gezeigt werden, dass hnRNP-Q und R in der Lage sind, die mRNA Degradation zu unterstützen (Kim *et al.*, 2005). Somit konnte ein positiver und ein negativer Einfluss von hnRNP-Q auf die mRNA Stabilität festgestellt werden.

HnRNP-U ist ein ssDNA- und RNA-bindendes Protein. Seine Primärstruktur enthält im N-Terminus eine DNA-Bindungsdomäne (SAP) und im Carboxy-Terminus RGG-Wiederholungen, welche die RNA-Bindungsdomäne ausmachen. Das Protein hnRNP-U enthält keine RRM bzw. KH RNA-Bindungsdomänen. Des Weiteren besitzt das Protein eine NLS (Kiledjian and Dreyfuss, 1992). HnRNP-U bindet an die scaffold attachment regions (SAR) und wird daher auch als scaffold attachment factor A (SAF-A) bezeichnet (Romig *et al.*, 1992). Seine zellulären Funktionen sind Regulation der Transkription und RNA Prozessierung. Über die Rolle von hnRNP-U in der Genexpression ist noch wenig bekannt. hnRNP-U ist auch in der Lage die mRNA Stabilität zu erhöhen (Yugami *et al.*, 2007).

In Zusammenhang mit HIV-1 konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass ein N-terminales Fragment von hnRNP-U die HIV-1 Replikation inhibieren kann. Untersuchungen mit Kern- und Zytoplasmafraktionen zeigten, dass der mRNA-Export durch das hnRNP-U Fragment inhibiert wurde (Valente and Goff, 2006).

HnRNP-K gehört zu den poly(C)-bindenden Proteinen und besitzt drei KH-Domänen (K homology domains), welche für die RNA- bzw. DNA-Bindung verantwortlich sind. HnRNP-K bindet genauso wie hnRNP-E1 und E2 an poly(C) Bereiche. Es besitzt eine NLS und eine nuclear shuttling domain (KNS). Außerdem besitzt hnRNP-K eine RGG-Domäne. Das Protein hnRNP-K ist beteiligt an vielen Prozessen der Genexpression (z.B. Transkription, RNA Prozessierung, Translation und Chromatin „Remodelling“) und an der Signaltransduktion (zusammengefasst in (Bomsztyk *et al.*, 2004; Dreyfuss *et al.*, 2002)). Hierbei interagiert hnRNP-K mit vielen zellulären Proteinen, z.B. mit dem TATA-box binding protein (TBP), Elongation factor 1 α (EF-1 α), hnRNP-E1, E2, I, L, den SR-Proteinen 9G8 und SRp20, der RNA-Helikase DDX1, zellulären Kinasen, Nucleolin, Sam68, etc. (Bomsztyk *et al.*, 2004; Bomsztyk *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2007; Michelotti *et al.*, 1996; Shnyreva *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002) (siehe auch Abbildung 4.3).

HnRNP-K bildet zusammen mit Sam68 einen Komplex mit der HIV-1 RRE. Es bindet die RRE allerdings nicht direkt, wohingegen zwischen hnRNP-K und Sam68 eine direkte Bindung vorhanden ist. Das Protein hnRNP-K inhibiert die Sam68-vermittelte RRE-abhängige Reporter Genexpression, jedoch nicht die Rev-vermittelte RRE-abhängige Reporter Genexpression. Hierbei scheint die Bindung zwischen den Proteinen hnRNP-K und Sam68 eine Rolle zu spielen. Die Interaktion zwischen den Proteinen Rev und hnRNP-K war vor der Arbeit nicht bekannt (Yang *et al.*, 2002).

Die Proteine **hnRNP-E1** und **E2** (alternative Benennung: PCBP1 und 2) sind ebenfalls poly(C)-bindende Proteine mit jeweils drei KH-Domänen. Die Funktionen dieser Proteine sind hauptsächlich die Stabilisierung der mRNA (hnRNP-E1 und E2) und die Regulation der Translation. Hierbei kann es zu einer Senkung der Translationsrate (hnRNP-E1), aber auch zu einer Steigerung der Translation (hnRNP-E2) kommen (zusammengefasst in (Makeyev and Liebhaber, 2002)). Die beiden Proteine hnRNP-E1 und E2 interagieren mit vielen zellulären Proteinen (Bedard *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2000; Mongelard and Bouvet, 2007; Wang *et al.*, 1999) (siehe Abbildung 4.3).

Woolaway *et al.* konnten zeigen, dass die Proteine hnRNP-E1 und E2 an die ESS3-Region im Tat exon 3 binden können und die Überexpression von hnRNP-E1 zu einer Reduktion der HIV-1 Gag und Env Produktion führt. Hierbei konnte keine

Veränderung des mRNA Spleißmusters beobachtet werden. Es wurde beobachtet, dass die Rev Expression durch die hnRNP-E1 Überexpression reduziert wurde. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob eine Bindung zwischen dem Rev-Protein und den beiden hnRNP Proteinen besteht. Untersuchungen der entsprechenden RNA und Proteinmengen legen die Vermutung nahe, dass sowohl die Rev als auch die Gag und Env Expression auf der Ebene der Translation von hnRNP-E1 inhibiert wurde (Woolaway *et al.*, 2007).

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die zellulären Funktionen der sieben hnRNP-Proteine viele verschiedene Prozesse der Genexpression umfassen. Sie sind unter anderem essentiell für die Schritte der Transkription, des Spleißens, des mRNA-Exports, der mRNA-Stabilität und der Translation. Zum Teil sind auch Zusammenhänge zwischen diesen Proteinen und HIV-1 bekannt (siehe vorherige Seiten). Daher scheint es nahe liegend, dass diese Proteine mit HIV-1 Rev, welches seinerseits die Expression später HIV-1 Genprodukte wesentlich reguliert, interagieren.

Betrachtet man die einzelnen Motive der hnRNP-Proteine näher, so lassen sich einige Unterschiede und einige Gemeinsamkeiten feststellen. Dieser Vergleich lässt auf eine mögliche Interaktionsdomäne der hnRNP-Proteine für die Bindung an das Rev-Protein schließen.

Die Proteine hnRNP-A1, Q und R besitzen RRM-Domänen als RNA-Bindungseinheiten. Die Proteine hnRNP-K, E1 und E2 besitzen hingegen KH-Domänen. HnRNP-U besitzt weder RRM- noch KH-Domänen (siehe Abbildung 4.2). Diese Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen lassen darauf schließen, dass weder die RRM- noch die KH-Domänen die hauptsächliche Bindungsdomäne für das Rev-Protein sein können.

In den Proteinen hnRNP-A1, Q, R, U und K ist jeweils eine so genannte RGG-Domäne vorhanden (siehe Abbildung 4.2), die mehrere Arginine (R) und Glycine (G) enthält und als RNA-Bindungsdomäne definiert ist (Dreyfuss *et al.*, 2002). Interessanterweise besitzen nur die Proteine Arginin-reiche Regionen (RGG-Bereiche), die in dieser Arbeit mit dem N-Terminus von Rev interagierten (hnRNP-A1, Q, R, U und K). Die beiden hnRNP-Proteine E1 und E2 besitzen keine RGG-

Domäne. Ein solches Muster könnte darauf hinweisen, dass die RRG-Regionen für die Interaktion dieser Proteine mit dem N-Terminus von Rev verantwortlich sind. Für das hnRNP-K Protein ist eine so genannte KI-Domäne („K interaktive region“) definiert, welche an vielen Interaktionen des hnRNP-K-Proteins mit zellulären Proteinen beteiligt ist. Sie überlappt fast vollständig mit der RRG-Domäne (Bomsztyk *et al.*, 2004). Dies zeigt, dass die RGG-Region an Proteininteraktionen beteiligt sein kann.

Die Proteine hnRNP-Q, R, U und K enthalten alle NLS-Kernlokalisierungssignale (siehe Abbildung 4.2). Demnach könnte die NLS-Region ebenfalls eine mögliche Interaktionsdomäne für die Bindung an den Rev N-Terminus darstellen. Die Tatsache, dass hnRNP-A1 keine NLS-Region besitzt und trotzdem mit dem N-Terminus des Rev-Proteins interagiert, spricht jedoch gegen die NLS-Region als gemeinsame Interaktionsdomäne aller fünf hnRNP-Proteine (hnRNP-A1, Q, R, U und K) für die Bindung an den Rev N-Terminus. Die Proteine hnRNP-E1 und E2 besitzen ebenfalls keine Kernlokalisierungssignale. Demnach können die NLS-Regionen ebenfalls nicht als mögliche Bindungsdomäne aller sieben hnRNP-Proteine für die Interaktion mit dem Rev-Protein definiert werden.

Der N-Terminus des Rev-Proteins besitzt einige saure Aminosäuren (Aspartate und Glutamate) (siehe Diskussionspunkt 4.3.1). Die RGG-Domänen der fünf hnRNP-Proteine enthalten viele basische Aminosäuren (Arginine). Diese basischen Regionen sind eine mögliche Grundlage für die Interaktion mit einer sauren Region. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass die RGG-Domäne die Bindung mit dem Rev N-Terminus eingeht.

Um diese Hypothese zu beweisen, könnte man in Deletions- und Mutationsexperimenten untersuchen, ob die Arginin-reichen Domänen der genannten Proteine tatsächlich die Interaktionsdomäne für das Rev-Protein darstellen. Hierfür könnte exemplarisch das hnRNP-A1-Protein in Hälften geteilt und rekombinant in *E. coli* herstellen werden. In Affinitätsreinigungen ließe sich analysieren, welche der beiden Hälften an rekombinantes Rev-Protein binden kann (zweite Hälfte enthält RGG-Motif). In einem zweiten Experiment könnten die RGG-Muster mutiert und die Bindung an das Rev-Protein untersucht werden. Hierbei ließe sich klären, ob dieses Muster für die Bindung verantwortlich ist.

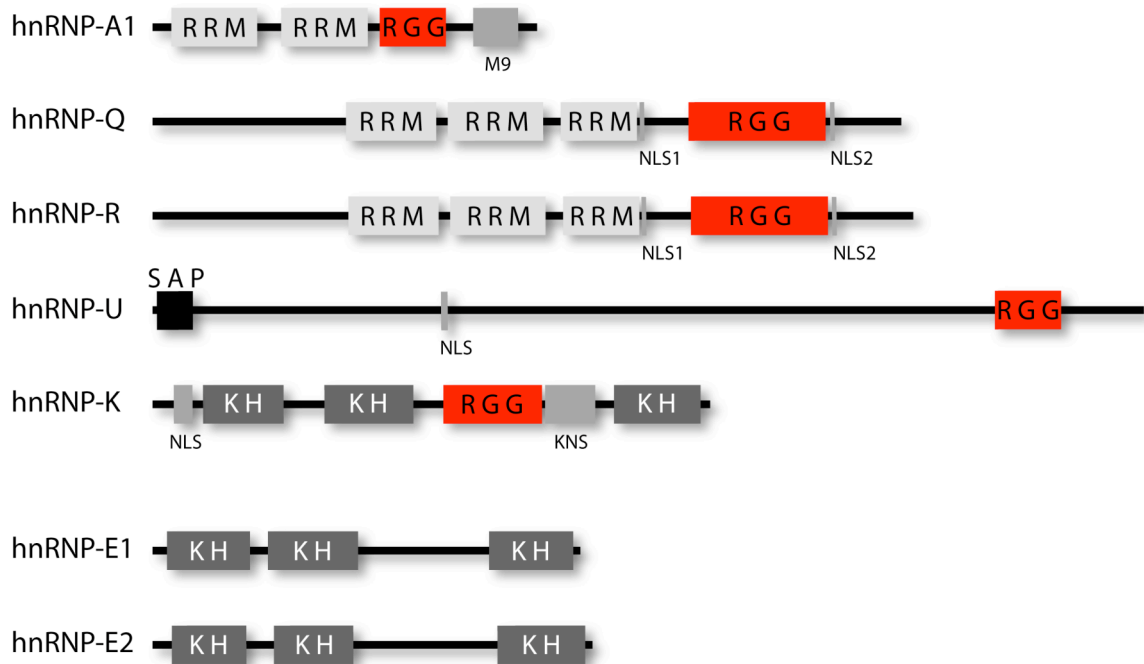


Abbildung 4.2.: Proteindomänen von verschiedenen hnRNP-Proteinen

Die Proteindomänen der Proteine hnRNP-A1, Q, R, U, K, E1 und E2 sind dargestellt. Die Proteine hnRNP-A1, Q, R und K, die mit dem N-Terminus des Rev-Proteins interagieren, besitzen Arginin-reiche Regionen. Diese könnten an der Bindung mit dem Rev-Protein beteiligt sein. Die Proteinen hnRNP-E1 und E2, welche mit dem N-Terminus des Rev-Proteins nicht interagieren, besitzen keine Arginin-reichen Regionen. RRM: RNA recognition motif, KH: K homology domain, RGG: Arginin- und Glycin-reiche Domäne, NLS: nuclear localization signal, M9: shuttle sequence, KNS: nuclear shuttling domain.

Die Rev-interagierenden Faktoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, interagieren auch zum Teil untereinander und mit anderen zellulären Proteinen. In Abbildung 4.3 ist ein Interaktionsnetzwerk zwischen dem Rev-Protein, den neuen Rev-interagierenden Faktoren und einigen bereits bekannten Rev-interagierenden Faktoren dargestellt. Das Netzwerk zeigt, dass die Proteine hnRNP-E1, E2, K, Nucleolin und PABP1 sehr stark untereinander und mit den Proteinen B23, Casein Kinase 2, DDX1, DDX3 und Sam68 vernetzt sind. Unter diesen Proteinen sind RNA-bindende Proteine, RNA Helikasen, eine Kinase und Multifunktionsproteine vertreten. Die Produktion viraler Genprodukte wird durch verschiedene Prozesse der Genexpression, die miteinander verknüpft sind, gesteuert. Hierbei ist eine Vielzahl von zellulären Proteinen beteiligt. Die Interaktion von HIV-1 Rev mit diesen Proteinen lässt annehmen, dass das Rev-Protein ebenfalls an diesen Prozessen beteiligt ist.

Die Funktion von Rev darf somit nicht nur auf den Export Intron-haltiger mRNA-Moleküle beschränkt werden. Das Funktionsspektrum umfasst viele weitere Bereiche der Genexpression. Die Beteiligung von Rev an der Translation wurde bereits in einigen Arbeiten gezeigt und diskutiert (Arrigo and Chen, 1992 a; D'Agostino *et al.*, 1992).

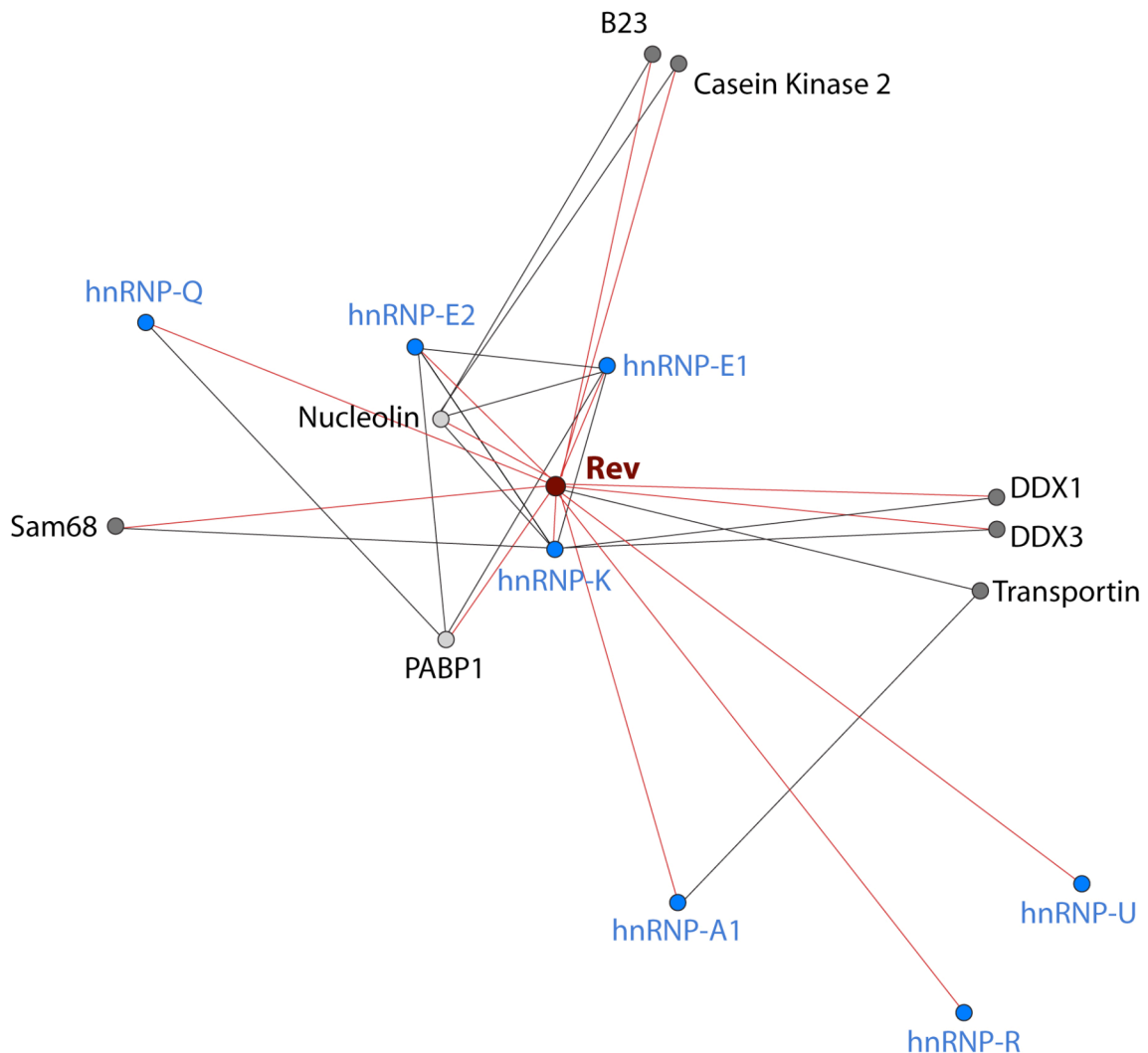


Abbildung 4.3.: Interaktionsnetzwerk des Rev-Proteins mit neuen und publizierten Rev-interagierenden Faktoren

Dargestellt ist ein Interaktionsnetzwerk zwischen Rev (rot) und mehreren zellulären Proteinen. Dunkelgraue Kreise zeigen publizierte Rev-interagierende Proteine. Blau Kreise kennzeichnen Proteine, die in dieser Arbeit als Rev-interagierende Faktoren identifiziert wurden. Die Proteine Nucleolin und PABP1 (hellgraue Kreise) wurden ebenfalls in dieser Arbeit mittels Affinitätschromatographie als Rev-interagierende Faktoren identifiziert, ihre Bindung an das Rev-Protein konnte jedoch mittels Co-Immunpräzipitation nicht verifiziert werden. Rote Linien zeigen Interaktionen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Schwarze Linien deuten auf Interaktionen aus der Literatur hin. Zunächst wurde bei der verwendeten Metrik die Länge einer Interaktionslinie zwischen zwei Proteinen beliebig festgelegt. Lag eine Interaktionslinie in einem Dreieck aus drei miteinander interagierenden Proteinen vor, so wurde die Länge der Interaktionslinie um ein Drittel verkürzt. Lag die gleiche Linie in mehreren Dreiecken vor, so wurde ihre Länge pro Dreieck erneut um ein Drittel verkürzt. Die Längen zwischen Nucleolin und hnRNP-E1 bzw. hnRNP-K und zwischen hnRNP-E2 und hnRNP-K entsprechen nicht der errechneten Länge. Diese müssten genauso lang wie die Verbindung zwischen hnRNP-E2 und PABP1 sein. Dies ließ sich jedoch aus geometrischen Gründen nicht realisieren.

4.3. Der N-Terminus des Rev-Proteins bindet mehrere hnRNP-Proteine und hat einen zelltypabhängigen Einfluss auf die Rev-Funktion

4.3.1. Interaktionssequenz für mehrere hnRNP-Proteine im N-Terminus von HIV-1 Rev

Die Proteine hnRNP-A1, Q, R, U und K interagierten in Affinitätsreinigungen mit der Deletionsmutante $\Delta 2-8\text{RevGFP-}Strep\text{TagII}$, aber nicht mit der $\Delta 2-14\text{RevGFP-}Strep\text{TagII}$ Deletionsmutante. Dies zeigt, dass diese Proteine mit dem N-Terminus des Rev-Proteins interagieren. Betrachtet man die Ergebnisse beider Reinigungen, so lässt sich eine Kernsequenz im Rev-Protein definieren, welche für die Interaktion mit den Proteinen hnRNP-A1, Q, R, U und K notwendig ist. Diese erstreckt sich von den Aminosäuren 9 bis 14 des Rev-Proteins. Diese Kernsequenz enthält drei saure Aminosäuren und überlappt zum Teil mit der so genannten NIS, welche als Diffusionsinhibitionssignal beschrieben ist (Fang *et al.*, 2002).

Die Bedeutung des N-Terminus für Rev wird in der Literatur kontrovers beschrieben. Mutationsstudien, in welchen die Aminosäuren 3 – 13 bzw. 3 – 16 deletiert wurden, zeigten weiterhin 89 % bzw. 72 % p24 Produktion (Jeong *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu waren Deletionsmutanten der Aminosäuren 4 – 18 (Malim *et al.*, 1989) oder der Aminosäuren 2 – 17 (Fang *et al.*, 2002) funktionslos.

In Abbildung 4.4 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von einigen funktionellen Rev-Isolaten dargestellt. Die Sequenzen zeigen, dass die Rev-Region von Aminosäure 9 bis 14 nicht an allen Aminosäurepositionen zu 100 % konserviert ist. Die NLS und die NES als essentielle Domänen des Rev-Proteins sind dagegen vollständig konserviert. Vergleicht man die Aminosäureunterschiede im Bereich der Aminosäuren 9 bis 14 im Detail, so lässt sich jeweils ein biochemisch konservierter Austausch der Aminosäuren feststellen. Dabei wird saures Glutamat (E) durch saures Aspartat (D), Isoleucin (I) durch Leucin (L) bzw. basisches Arginin (R) durch basisches Lysin (K) ersetzt (siehe Abbildung 4.4).

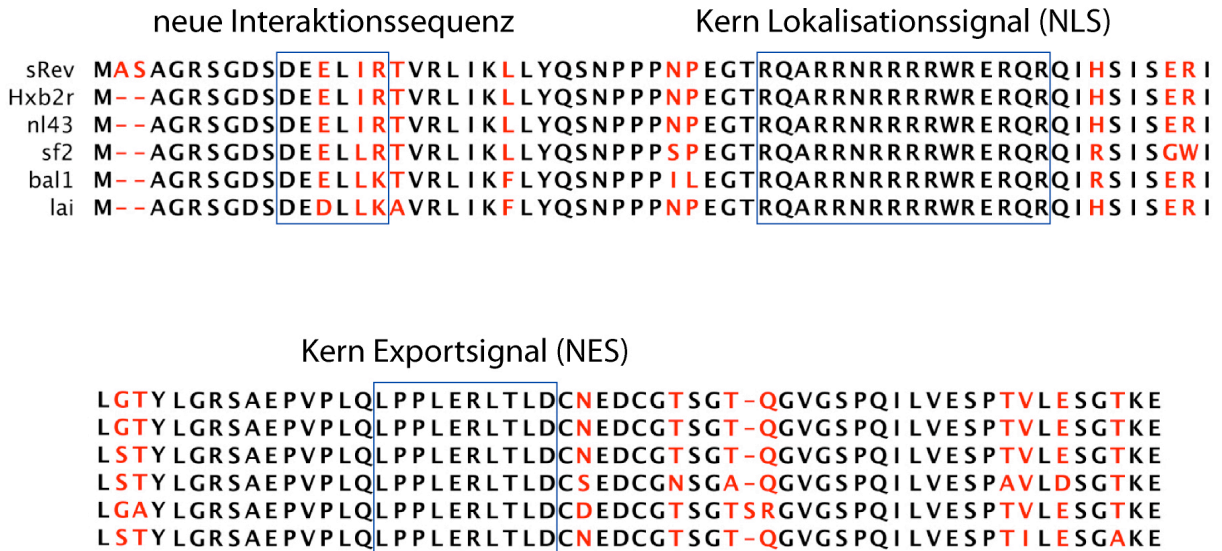


Abbildung 4.4.: Vergleich des N-Terminus von einigen funktionellen Isolaten

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von einigen funktionellen Rev Isolaten. Hervorgehoben ist der N-Terminus des Rev-Proteins und das Lokalisations- bzw. Exportsignal (NLS; NES). Rot markiert sind Aminosäurepositionen, die innerhalb der Isolate keine einheitliche Konservierung zeigen. Der N-Terminus von Rev ist nicht an allen Aminosäurepositionen zu 100 % identisch. Die Aminosäureaustausche sind jedoch biochemisch konservativ.

4.3.2. Die Deletion der Aminosäuren 2 – 14 des Rev-Proteins führt zu einem Funktionsverlust von Rev in HeLa-Zellen, jedoch nicht in Astrozyten

Der Einfluss des Rev N-Terminus auf die Rev Funktion wurde in dieser Arbeit untersucht. Die Analysen wurden in zwei unterschiedlichen Zelllinien (HeLa-Zellen und Astrozyten) im Rev-Reportersystem durchgeführt.

Diese Untersuchungen zeigten, dass die Mutante Δ 2-8RevGFP in HeLa-Zellen die gleiche Funktion wie Wildtyp-RevGFP besaß. In Astrozyten konnte eine leicht gesteigerte Aktivierungsfunktion nachgewiesen werden. Die Deletionsmutante Δ 2-14RevGFP hatte einen deutlichen Funktionsverlust von etwa 50 % im Vergleich zu Wildtyp-RevGFP in HeLa-Zellen. Im Gegensatz dazu war keine Veränderung der Funktion in Astrozyten zu sehen.

Diese Daten zeigen, dass eine Deletion im N-Terminus des Rev-Proteins (Aminosäuren 2 – 14) zelltypabhängig einen Einfluss auf seine Funktion hat.

4.4. Zelltypabhängige Interaktion von Rev mit hnRNP-A1

Die Untersuchung der Interaktion von hnRNP-A1 mit Rev zeigte, dass in Astrozyten eine Bindung zwischen diesen beiden Proteinen vorlag. In HeLa-Zellen konnte diese Interaktion nicht nachgewiesen werden.

Ein Grund für die zelltypabhängige Bindung von Rev an hnRNP-A1 könnte sein, dass in Astrozyten und in HeLa-Zellen unterschiedliche Isoformen des hnRNP-A1-Proteins exprimiert werden. hnRNP-A1 besitzt zwei Isoformen. Eine Isoform ist aus 320 Aminosäuren, die zweite aus 372 Aminosäuren aufgebaut. Würde in Astrozyten die längere und in HeLa-Zellen die kürzere Isoform exprimiert, könnten die 52 fehlenden Aminosäuren des hnRNP-A1-Proteins in HeLa-Zellen ausschlaggebend für die nicht nachweisbare Interaktion sein. Um dies zu prüfen wurden in dieser Arbeit die Isoformen in beiden Zelllinien mittels RT-PCR untersucht. Die Analysen ergaben, dass beide Zelllinien überwiegend die verkürzte hnRNP-A1 Isoform exprimieren (Daten nicht gezeigt). Daher können unterschiedliche Isoformen des hnRNP-A1-Proteins in den zwei Zelllinien nicht der Grund für die zelltypabhängige Bindung von hnRNP-A1 an das Rev-Protein sein.

Eine weitere Möglichkeit, um das unterschiedliche Bindungsverhalten von hnRNP-A1 und Rev zu erklären, wäre, dass hnRNP-A1 in den beiden Zelllinien in verschiedenen zellulären Komplexen vorliegt, welche mit Rev interagieren oder aber nicht. Dieser Fall müsste durch vergleichende Komplexanalysen in den beiden Zelllinien untersucht werden.

Des Weiteren könnten posttranslationale Modifikationen des hnRNP-A1-Proteins in den beiden Zelllinien ausschlaggebend dafür sein, ob eine Interaktion mit dem Rev-Protein stattfindet oder nicht. Hierbei könnte in HeLa-Zellen entweder eine Modifikation fehlen, die wichtig für die Ausbildung der Interaktion ist oder es könnte eine Modifikation vorliegen, welche die Bindung von hnRNP-A1 an Rev verhindert. Posttranslationale Modifikationen des Rev-Proteins sind als Erklärungsmöglichkeit unwahrscheinlich, da vier weitere zelluläre Proteine (hnRNP-Q, R, U und K) in beiden Zelllinien mit dem Rev N-Terminus interagierten. Bei verschiedenen Modifikationen des Rev-Proteins in den beiden Zelllinien hätten auch andere Proteine zelltypabhängig an Rev binden müssen.

Der Einfluss posttranslativ Modifikationen des hnRNP-A1-Proteins auf seine Interaktion mit dem Rev-Protein wurde in aktuell laufenden Analysen untersucht und

es konnte gezeigt werden, dass bakteriell hergestelltes hnRNP-A1 und RevGFP-*StrepTagII* (Kontrolle: GFP-*StrepTagII*) in Affinitätsreinigungen miteinander interagieren (Daniel Nagel, HelmholtzZentrum München). Beide Proteine besaßen in diesem Experiment keine für eukaryotische Zellen relevanten posttranslationalen Modifikationen. Dieses Ergebnis zeigt, dass keine ausdrückliche posttranslationale Modifikation des hnRNP-A1-Proteins vorhanden sein muss, damit die Proteine hnRNP-A1 und Rev aneinander binden. Demnach wäre die Verhinderung der Interaktion zwischen hnRNP-A1 und Rev durch eine vorhandene Modifikation des hnRNP-A1-Proteins in HeLa-Zellen, welche in Astrozyten nicht vorkommt, am naheliegendsten. Eine solche posttranslationale Modifikation könnte die Dimethylierung der Arginine R193, R205, R217 und R224 von hnRNP-A1 durch das Enzym Protein-Arginin Methyltransferase 1 (PRMT1) sein, welche in HeLa-Zellen bereits nachgewiesen werden konnten (Kim *et al.*, 1997). Diese vier Arginine liegen alle in der RGG-Domäne des hnRNP-A1-Proteins. Sollte die RGG-Domäne die Interaktionsdomäne von hnRNP-A1 für die Bindung an den Rev N-Terminus sein (diskutiert in Abschnitt 4.2.2), könnten die Methylierung der Arginine in HeLa-Zellen die Interaktion zwischen hnRNP-A1 und Rev unterbinden. Falls diese Modifikationen in Astrozyten nicht vorliegen, könnte dies eine Erklärung für die zelltypabhängige Bindung zwischen dem hnRNP-A1-Protein und dem Rev-Protein in den beiden Zelllinien sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, müsste das hnRNP-A1-Protein aus beiden Zelllinien isoliert (z.B. durch Immunpräzipitation) und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie auf posttranslationale Modifikationen untersucht werden.

Die Dimethylierungen der RGG-Domäne als Ursache für die Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen konnte bereits am Beispiel von hnRNP-K demonstriert werden (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Das Protein hnRNP-K wird an fünf Argininen (R256, R258, R268, R296 und R299) innerhalb der RGG-Domäne von dem Enzym Protein-Arginin Methyltransferase 1 (PRMT1) dimethyliert. Dieses Enzym ist das gleiche Enzym, welches auch hnRNP-A1 in HeLa-Zellen dimethyliert. Bindungsstudien zwischen hnRNP-K und c-Src zeigten, dass diese beiden Proteine miteinander interagierten, wenn hnRNP-K nicht methyliert vorlag. Sobald das hnRNP-K-Protein von PRMT1 methyliert wurde, konnte eine schwächere Bindung zwischen hnRNP-K und c-Src nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, dass die Dimethylierung der RGG-Domäne von hnRNP-K die Interaktionseigenschaft dieser Region herabsetzt.

In Astrozyten ist die HIV-1 Replikation im Vergleich zu HIV-permissiven Zellen herabgesetzt (Ludwig *et al.*, 1999). Es ist gezeigt worden, dass Sam68 in der U87MG Astrozytenzelllinie in geringeren Mengen vorliegt und durch eine HIV Infektion zusätzlich verringert wird (Li *et al.*, 2002). Zudem ist bekannt, dass DDX1 in Astrozyten im Vergleich zu HeLa-Zellen ein verändertes Lokalisationsverhalten besitzt. Es lokalisiert verstärkt im Zytoplasma (Fang *et al.*, 2004). Beide Tatsachen haben einen negativen Effekt auf die HIV-1 Replikation in Astrozyten. Des Weiteren wurde gezeigt, dass in Astrozyten die Translation der Gag und Env-Proteine ineffizient funktioniert (Gorry *et al.*, 1998).

An dieser Stelle soll ein weiterer, möglicher Grund für die verminderte Rev Funktion bzw. verminderte HIV-1 Replikation in Astrozyten diskutiert werden. Die zelltypabhängige Bindung von hnRNP-A1 an Rev könnte ebenfalls einen Einfluss auf die herabgesetzte HIV-1 Replikation in Astrozyten haben. In Abbildung 4.5 ist diese Hypothese schematisch dargestellt.

HIV-1 Rev bindet an das RRE und vermittelt den Export Intron-haltiger RNA ins Zytoplasma. Das Protein hnRNP-A1 bindet an eine bestimmte Sequenz im p17gag und unterstützt den Rev-vermittelten Export Intron-haltiger RNA (Najera *et al.*, 1999). In HeLa-Zellen bindet hnRNP-A1 nicht an das Rev-Protein. Somit können beide Proteine ungestört an die jeweilige Sequenz auf der RNA binden und den Export vermitteln. Dadurch besitzt Rev in diesen Zellen volle Funktion. In Astrozyten interagieren die Proteine hnRNP-A1 und Rev miteinander. Somit liegt ein bestimmter Teil dieser beiden Proteine in einem Komplex vor. Dadurch könnten sich diese beiden Proteine blockieren, wodurch ein gewisser Teil beider Proteine nicht an die jeweilige Zielsequenz auf der RNA bindet, um den Export zu vermitteln. Diese Situation hätte eine Herabsetzung der Rev-Funktion in Astrozyten zur Folge.

Diese Theorie wird unterstützt, wenn man die Funktionalität der $\Delta 2-14$ RevGFP Mutante in den beiden Zelllinien betrachtet. In HeLa-Zellen besitzt diese Rev-Deletionsmutante eine reduzierte Funktion um etwa 50 % im Vergleich zu Wildtyp-RevGFP. Der Grund für diesen Funktionsverlust wird durch dieses Modell nicht geklärt und muss noch weiter untersucht werden. In Astrozyten zeigt die Deletionsmutante dagegen keinen Funktionsverlust.

Die $\Delta 2-14$ RevGFP Mutante interagiert nicht mit hnRNP-A1, da der N-Terminus, der wichtig für die Interaktion ist, fehlt. Daher entsteht durch den Einsatz von

$\Delta 2$ -14RevGFP in Astrozyten die gleiche Bindungssituation mit dem hnRNP-A1-Protein, wie sie in HeLa-Zellen mit Wildtyp-RevGFP vorliegt. Es ist keine Interaktion zwischen $\Delta 2$ -14RevGFP und hnRNP-A1 in Astrozyten vorhanden. Dies hat zur Folge, dass sich diese beiden Proteine nicht blockieren und beide an die RNA binden können. Der ursprüngliche Funktionsverlust, den die Deletionsmutante besitzt (siehe in HeLa-Zellen), wird in Astrozyten dadurch kompensiert, dass die Proteine $\Delta 2$ -14RevGFP und hnRNP-A1 sich nicht gegenseitig durch eine Interaktion hindern. Dadurch kommt es in Astrozyten zu keinem weiteren Funktionsverlust.

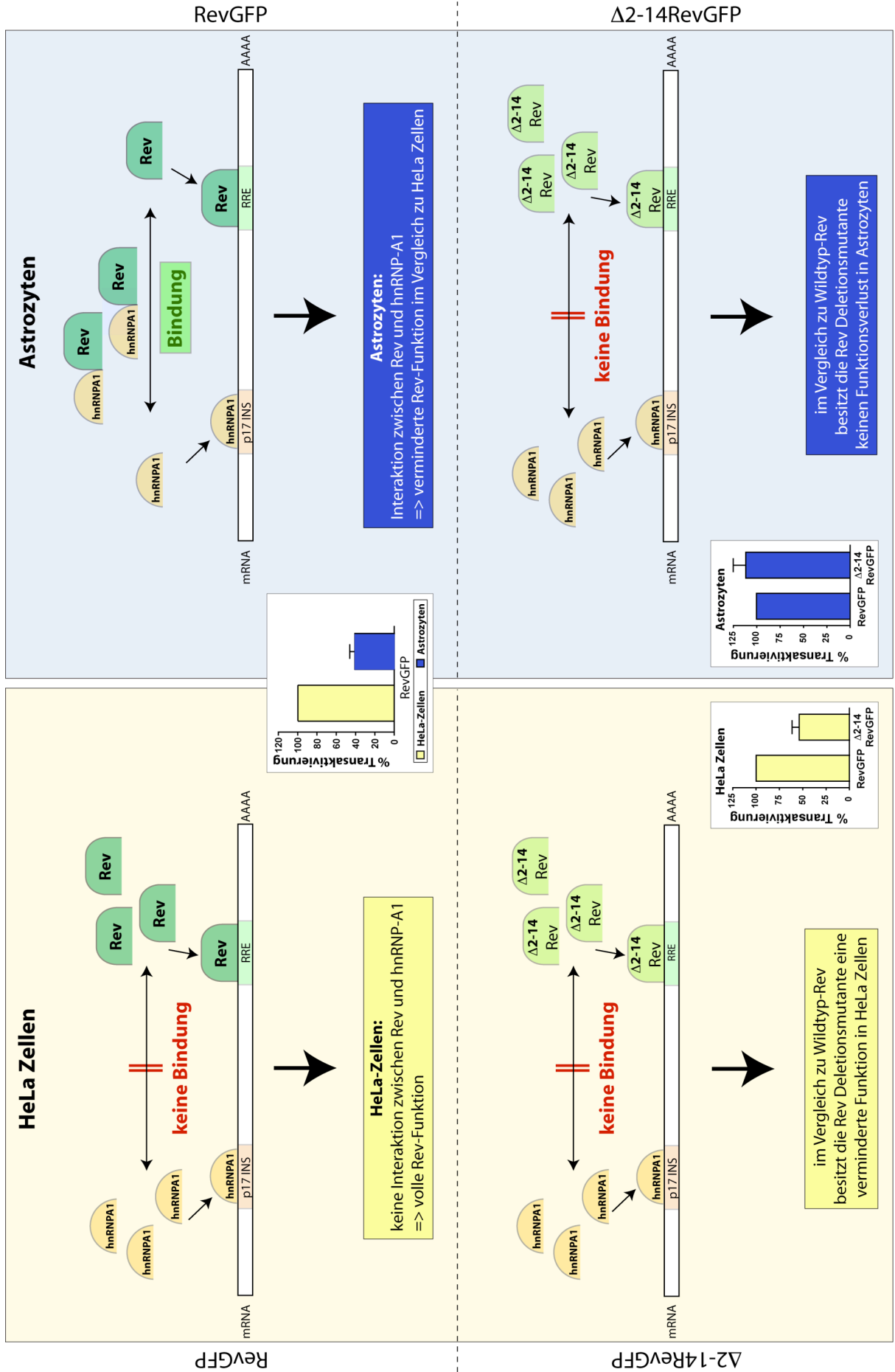
Die reduzierte Aktivierungsfunktion des Rev-Proteins und die damit verbundene Verminderung der HIV Replikationsfähigkeit in Astrozyten lässt sich sicherlich nicht auf einen einzelnen Effekt reduzieren. Es gibt viele Aspekte, die jeweils zu dem Funktionsverlust des Rev-Proteins in Astrozyten beitragen können. Hier wurde ein weiterer Effekt diskutiert, der sich infolge zelltypspezifischer Bindungsverhalten von Rev mit einem zellulären Protein (hnRNP-A1) erklären lässt.

Abbildung 4.5. (nächste Seite): Neues Modell für die zelltypabhängige Wirkungsweise von hnRNP-A1

Das Protein hnRNP-A1 bindet an die p17INSgag-Region und das Rev Protein an die RRE auf der RNA. Die Bindung beider Proteine an die RNA aktiviert den Transport ungespleißter bzw. einfach gespleißter RNA-Moleküle ins Zytoplasma. In HeLa Zellen ist keine Bindung zwischen den Proteinen hnRNP-A1 und Rev detektierbar. Dadurch können beide Proteine ungehindert an die RNA binden. Dies führt zu einer hohen Rev-abhängigen Reporterprotein-Produktion. In Astrozyten besteht jedoch eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen. Diese Bindung könnte einen Teil beider Proteine daran hindern die RNA zu binden. Dadurch würde eine reduzierte Reporterprotein-Produktion in Astrozyten entstehen.

In HeLa Zellen ist die Transaktivierungsfunktion der Deletionsmutante $\Delta 2$ -14RevGFP um etwa 50 % reduziert. Der Grund hierfür kann mit diesem Modell nicht geklärt werden. In Astrozyten zeigt diese Deletionsmutante jedoch keinen Funktionsverlust. Dies könnte dadurch zustande kommen, dass diese Deletionsmutante nicht an das hnRNP-A1-Protein bindet und somit in Astrozyten den gleichen Bindungsstatus besitzt, wie Wildtyp-RevGFP in HeLa Zellen. Die Proteine hnRNP-A1 und Rev hindern sich nicht gegenseitig an der RNA-Bindung. Dieser Effekt kompensiert somit die geringere Funktion, welche die Deletionsmutante $\Delta 2$ -14RevGFP besitzt (siehe HeLa-Zellen).

Diese Hypothese könnte dazu beitragen, dass die Rev Funktion und daraus resultierend die HIV-1 Replikation in Astrozyten herabgesetzt ist.



4.5. Die Proteine hnRNP-A1 und Q sind Stimulatoren der Rev-abhängigen Reporterprotein-Produktion

Der Einfluss von hnRNP-A1 und hnRNP-Q auf die Rev-vermittelte Reporterprotein-Produktion wurde mit dem publizierten Rev-Reportersystem (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005a; Wolff, 2003) durchgeführt.

Das Reportersystem besteht aus einer Reporter-DNA, einer daraus transkribierten Reporter-mRNA und dem schließlich translatierten Reporterprotein *DsRed1*. In dieser Arbeit wurde mittels FACS Analyse ausschließlich die Produktion des Reporterproteins unter dem Einfluss der Rev-interagierenden Faktoren untersucht.

Die Proteine hnRNP-A1 und hnRNP-Q konnten bei Co-Expression mit RevGFP die Reporterprotein-Produktion in HeLa-Zellen und Astrozyten steigern. Auch eine Co-Expression mit den Deletionsmutanten $\Delta 2-8$ RevGFP und $\Delta 2-14$ RevGFP führte zu einer Erhöhung der Reporterprotein-Produktion in beiden Zelllinien. Wurden die beiden hnRNP-Proteine zusammen mit GFP exprimiert, konnte in beiden Zelllinien keine Steigerung beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass für die Steigerung der Reporterprotein-Produktion durch die Stimulatoren hnRNP-A1 und Q die Co-Expression einer RevGFP-Variante zwingend nötig ist. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Bindung von Rev an die beiden hnRNP-Proteine eine Rolle beim Anstieg der Reporterprotein-Produktion spielt oder eine solche Bindung nicht notwendig ist. Es könnte auch sein, dass es sekundäre Bindungsstellen im Rev-Protein gibt, an welche die hnRNP-Proteine mit einer geringeren Effizienz binden können und dadurch die Stimulation der Reporterprotein-Produktion bewirken.

Im Falle von hnRNP-A1 könnte eine Bindung zwischen hnRNP-A1 und Rev eher von Nachteil sein, da die beiden Proteine an unterschiedliche Regionen auf der RNA (p17INS gag bzw. RRE) binden, um den Export der RNA zu vermitteln (siehe Diskussionspunkt 4.4 und Abbildung 4.5). Außerdem interagieren hnRNP-A1 und Rev in HeLa-Zellen nicht miteinander und es konnte trotzdem eine Steigerung der Reporterprotein-Produktion nachgewiesen werden. Daher ist der Einfluss von hnRNP-A1 auf die Reporterprotein-Produktion höchstwahrscheinlich über die Bindung an die RNA zu erklären. Es ist bereits bekannt, dass hnRNP-A1 den Export Intron-haltiger RNA fördert (Najera *et al.*, 1999). Für hnRNP-Q lässt sich die Frage nach der Notwendigkeit einer Bindung an Rev nicht eindeutig klären. In den Affinitätschromatographie-Untersuchungen mit der Deletionsmutante $\Delta 2-14$ RevGFP-

*Strep*TagII konnte gezeigt werden, dass hnRNP-Q und Rev nicht miteinander interagieren, wobei eine sehr schwache hnRNP-Q-Bande in der Elutionsfraktion nachweisbar war. Es könnte sein, dass nur ein sehr geringer Teil der Δ 2-14RevGFP-Moleküle mit hnRNP-Q interagiert, indem hnRNP-Q an sekundäre Bindungsstellen des Rev-Proteins bindet und dies ausreicht, damit in diesem Testsystem die Reporterprotein-Produktion gesteigert wird. Die Steigerung der Reporterprotein-Produktion mittels hnRNP-Q könnte aber auch durch die Stabilisierung der Reporter-mRNA oder durch einen positiven Einfluss bei der Translation erfolgen. Vorläufige Daten bei der Untersuchung der Reporter-mRNA, welche zurzeit im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wird, zeigten höhere Mengen an Reporter-Transkripten nach Expression von hnRNP-Q-CYN im Vergleich zur CYN-Kontrolle (Daniel Nagel, HelmholtzZentrum München). Dies könnte für eine Stabilisierung der Reporter-Transkripte oder Erhöhung der Transkriprate durch hnRNP-Q sprechen.

4.6. Die Proteine hnRNP-A1 und Q steigern die p24 Produktion in chronisch HIV-1 infizierten Zelllinien

Nachdem das Rev-Reportersystem trotz der vielen HIV-1 Elemente ein artifizielles System darstellt, wurde zusätzlich der Einfluss von hnRNP-A1 und Q auf die HIV-1 Replikation untersucht. Hierzu wurden die chronisch HIV-1 infizierten HeLa-Zellen (LC5-HIV), welche viel HIV-1 produzieren, und Astrozytomzellen (TH4-7-5), welche wenig HIV-1 produzieren, verwendet. Auch in diesem System wurde die Produktion eines Proteins als Messparameter herangezogen. Die Produktion des viralen Genprodukts p24 (intra- und extrazellulär) wurde unter Einfluss der Rev-interagierenden Faktoren bestimmt. Das Protein p24 ist ein spätes HIV-1 Genprodukt. Durch die Bestimmung der p24 Menge im Überstand und im Zelllysat kann die relative Produktion von intrazellulärem p24 und freigesetzten Viren mittels ELISA ermittelt werden.

Die Expression der Proteine hnRNP-A1 und Q steigerte sowohl intra- als auch extrazellulär die Produktion des p24-Proteins. Somit konnte durch die Überexpression dieser Proteine die HIV-1 Replikation stimuliert werden. Allerdings blieben die Absolutwerte der HIV-1 Produktion in Astrozyten selbst bei Überexpression dieser Proteine weit unter denen in den LC5-HIV Zellen.

Das hnRNP-A1-Protein fungiert im HIV-1 Kontext als Spleißinhibitor (Stoltzfus and Madsen, 2006) und unterstützt den Export Intron-haltiger mRNA-Moleküle (Najera *et al.*, 1999). Diese beiden Eigenschaften könnten die Steigerung der p24 Produktion nach einer hnRNP-A1 Überexpression erklären. Diese Annahme müsste jedoch durch die Untersuchung der HIV-1 mRNA-Transkripte nach Überexpression von hnRNP-A1 untersucht werden. Der positive Einfluss von hnRNP-A1 auf die HIV-1 Replikation wurde durch die Verwendung von spezifischen siRNAs bestätigt. Nach Behandlung der Zellen mit sihnRNP-A1 konnte eine Abnahme der p24 Produktion beobachtet werden.

Die Erhöhung der p24 Produktion nach hnRNP-Q Expression lässt sich nicht eindeutig erklären. Es ist gezeigt worden, dass hnRNP-Q das Spleißen fördert (Mourelatos *et al.*, 2001). In diesem Fall würde jedoch ein erhöhtes Spleißen der HIV-1 RNA zu einer Senkung der p24 Produktion führen. An dieser Stelle könnte hnRNP-Q bei der Translation, der Transportrate oder der Stabilität der HIV-1 mRNA einen Einfluss haben. Um dies zu klären, müssten noch weitere Untersuchungen auf der Ebene der mRNA durchgeführt werden.

4.7. Bedeutung der Interaktion von Rev mit hnRNP-Proteinen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mehrere hnRNP-Proteine spezifisch an das Rev-Protein binden. Zwei dieser hnRNP-Proteine besaßen einen Einfluss auf die HIV-1 Replikation. Daher stellt sich die Frage nach der Bedeutung dieser Interaktion. Eine wichtige Eigenschaft der hnRNP-Proteine ist die Fähigkeit RNA zu binden. Die RNA ist in der Zelle fast vollständig mit hnRNP-Proteinen besetzt. Deswegen werden hnRNP-Proteine auch als „Histone der RNA“ bezeichnet (Reed and Magni, 2001).

HIV-1 Rev bindet die RNA über die Interaktion mit der RRE und vermittelt den Export dieser RNA ins Zytoplasma (siehe Abbildung 4.6). Der Mechanismus, wie das Rev-Protein Intron-haltige RNA-Moleküle in der Zelle findet und bindet, ist bislang noch ungeklärt. Eine zufällige Bindung des Rev-Proteins an das RRE wäre bei einer für die HIV-1 Replikation so entscheidenden Interaktion kaum denkbar.

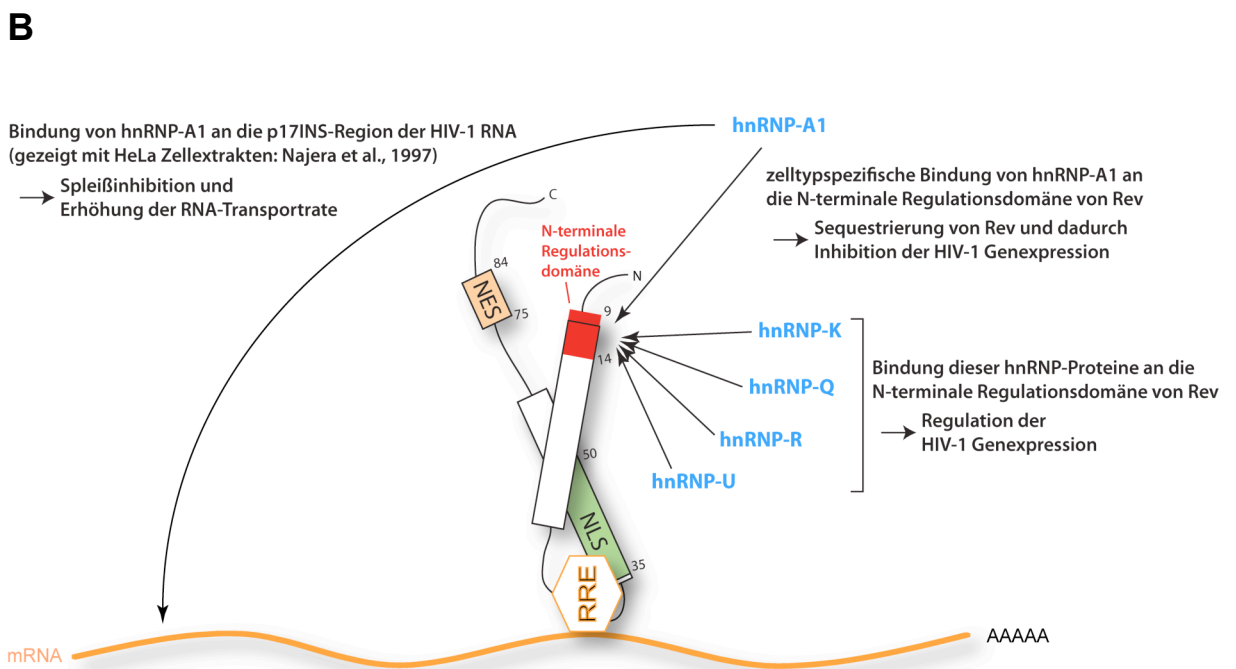
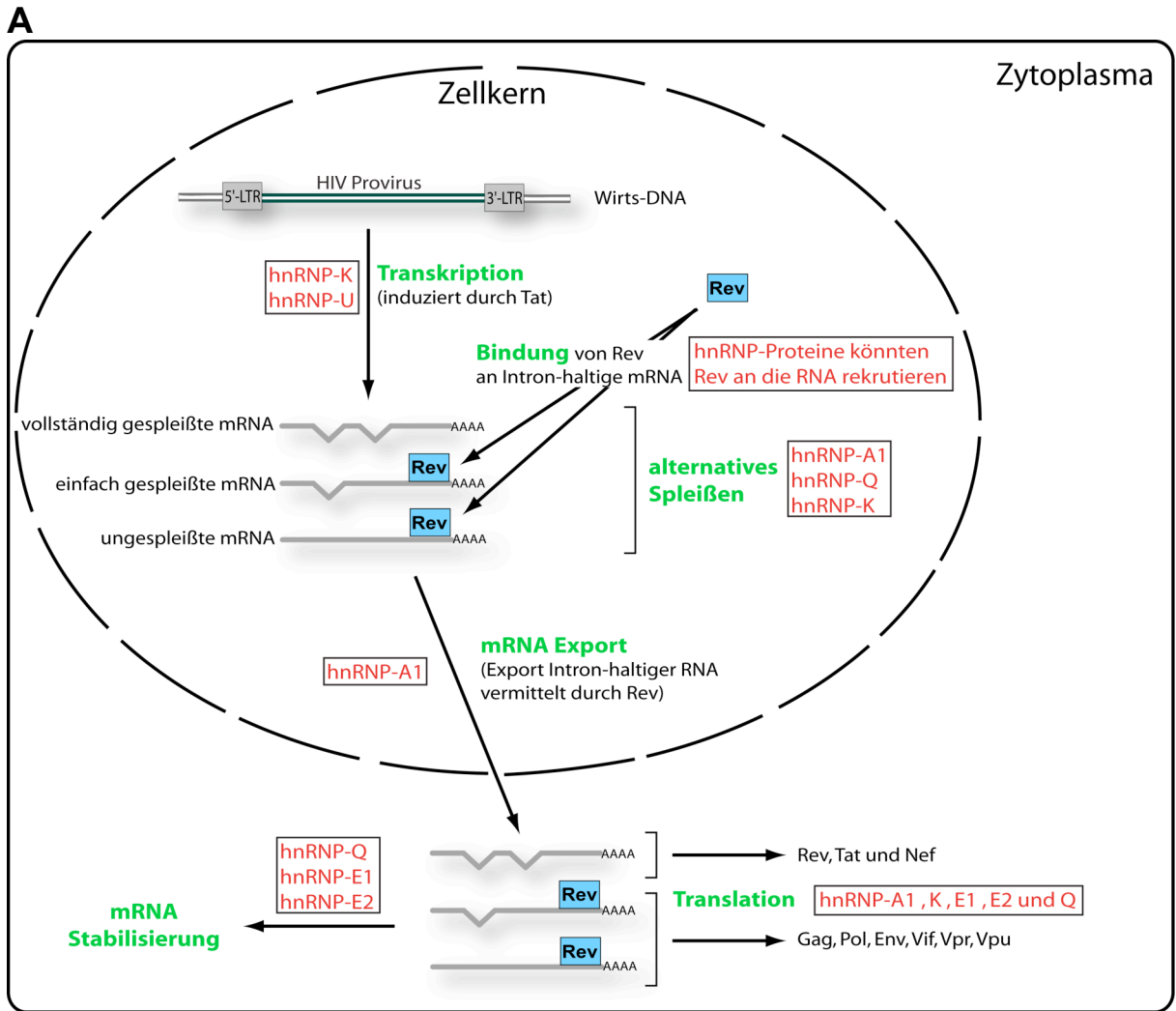
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Rev-Protein nicht mit der RNA Polymerase II interagiert. Außerdem konnte bislang keine Interaktion zwischen Rev und Tat nachgewiesen werden. Somit können diese beiden Proteine die Rekrutierung von Rev an die RNA nicht vermitteln. Es wäre möglich, dass die in

dieser Arbeit identifizierten Rev-interagierenden Proteine (hnRNP-Proteine) die Bindung des Rev-Proteins an seine Ziel-RNA fördern. HnRNP-Proteine kommen im Zellkern von Eukaryoten in großen Mengen vor und binden RNA-Moleküle kotranskriptionell (Reed and Magni, 2001). Hierbei könnten sie das Rev-Protein an die virale RRE-RNA rekrutieren.

Nach erfolgreicher Bindung des Rev-Proteins an die RNA, könnte die Interaktion zwischen dem Rev-Protein und hnRNP-Proteinen die HIV-1 Genexpression unterstützen. Die in dieser Arbeit identifizierten, Rev-interagierenden hnRNP-Proteine haben sehr viele Funktionen, die Einfluss auf alle Schritte der Genexpression haben (siehe Abbildung 4.6/A). Diese Proteine spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Transkription (hnRNP-K und U), beim alternativen Spleißen (hnRNP-A1, Q und K), beim RNA-Export (hnRNP-A1), bei der mRNA Stabilität (hnRNP-E1, E2 und Q) und bei der Translation (hnRNP-A1, K, E1, E2 und Q). Nachdem Rev die RNA vom Spleißen über den Export bis hin zur Translation begleitet, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Interaktion von Rev mit den hnRNP-Proteinen zur Regulation der einzelnen Schritte der Genexpression beiträgt. Diese Regulation könnte über den N-Terminus des Rev-Proteins erfolgen, welches somit eine Regulationsdomäne darstellen könnte (Abbildung 4.6/B).

Abbildung 4.6. (nächste Seite): Beteiligung von hnRNP-Proteinen an verschiedenen Prozessen der Genexpression

(A) Das HIV-1 Rev-Protein bindet an die RRE-Region Intron-haltiger RNA-Moleküle und vermittelt deren Export in das Zytoplasma. Der Mechanismus, mit dem das Rev-Protein die RNA im Zellkern bindet, ist nicht genau geklärt. Eine Interaktion von HIV-1 Rev mit hnRNP-Proteinen könnte diesen Mechanismus erklären. HnRNP-Proteine binden als hnRNP-Komplexe an die RNA und könnten das Rev-Protein an die RNA rekrutieren. Des Weiteren sind hnRNP-Proteine an der mRNA Transkription (hnRNP-K und U), am alternativen Spleißen der mRNA (hnRNP-A1, Q und K), am mRNA Export (hnRNP-A1), an der mRNA Stabilität (hnRNP-Q, E1 und E2) und an der mRNA Translation (hnRNP-A1, K, E1, E2 und Q) beteiligt. Alle diese Prozesse sind essentiell für die Produktion von viralen Genprodukten. HIV-1 Rev ist ebenfalls am Spleißen, am mRNA Export und an der Translation beteiligt. **(B)** Daher könnte die Interaktion des Rev-Proteins über seinen N-Terminus (Regulationsdomäne) mit den hnRNP-Proteinen diese Prozesse regulieren. Im Falle von hnRNP-A1 könnte die Bindung mit Rev zu einer Sequestrierung des Rev-Proteins und somit zur Inhibition der HIV-1 Genexpression führen. Die positive Regulation der Genexpression könnte über die Bindung von hnRNP-A1 an die HIV-1 RNA erfolgen.



5. Zusammenfassung

HIV-1 Rev aktiviert die Produktion von Viruspartikeln in infizierten Zellen. Rev bindet an eine spezifische Sequenz in HIV RNAs und fördert die Stabilität, den Transport in das Zytoplasma und die Translation seiner Ziel-RNAs. Die Effizienz der Rev-abhängigen Aktivierung der HIV Genexpression ist zelltypabhängig. In Astrozyten, die nach Infektion kaum HIV produzieren, ist die Rev-abhängige Expression sehr schwach im Vergleich zu HeLa-Zellen, die effiziente HIV-Produzenten sind. Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Astrozyten auf Rev-interagierende Faktoren. Des Weiteren sollte der Einfluss ausgewählter Faktoren auf die Rev-Funktion und auf die HIV-1 Replikation untersucht werden.

Mit Hilfe der *Strep*TagII-Affinitätschromatographie konnte die Interaktion von rekombinantem Rev-Protein mit den RNA-bindenden Proteinen hnRNP-A1 und Q aus Astrozytenzelllysaten gezeigt werden. Die Bindung von Rev an diese Proteine in Astrozyten wurde durch Co-Immunpräzipitation bestätigt. In HeLa-Zellen konnte die Interaktion von Rev mit hnRNP-Q durch biochemische und zelluläre Tests bestätigt werden. Jedoch wurde in HeLa-Zellen keine Interaktion mit dem hnRNP-A1-Protein festgestellt, was auf eine zelltypabhängige Interaktion von Rev mit hnRNP-A1 deutet. Interaktionsanalysen von Astrozytenzelllysaten und N-terminalen Rev-Deletionsmutanten (Δ 2-8RevGFP und Δ 2-14RevGFP) wiesen auf eine essentielle Rolle der Aminosäuren 9 – 14 des Rev-Proteins für die Interaktion von Rev mit hnRNP-A1 und Q hin. Funktionsanalysen zeigten, dass der Einfluss der N-terminalen Region von Rev auf die Rev-abhängige Reporterprotein-Produktion zelltypabhängig ist. Analysen zur Bedeutung von hnRNP-A1 und Q zeigten, dass die HIV-1 Produktion bzw. die Rev-abhängige Reporterprotein-Produktion durch Überexpression dieser Faktoren in allen untersuchten Zelllinien gesteigert werden konnte. Dies bestätigt eine Rolle von hnRNP-A1 und Q als Stimulatoren der HIV-Produktion. Schließlich wurde die Bindung von Rev an weitere hnRNP-Proteine untersucht. Hierbei konnte die Interaktion der Proteine hnRNP-E1, E2, K, R und U mit dem Rev-Protein in Astrozyten gezeigt werden. Jedoch interagierten nur die Proteine hnRNP-K, R und U mit dem N-Terminus des Rev-Proteins. Die Bindung des Rev-Proteins an die Proteine hnRNP-R und U konnte auch in HeLa-Zellen nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Rev-Protein mit zellulären hnRNP-Proteinen interagiert und dass eine Kernsequenz im N-Terminus des Rev-Proteins eine essentielle Rolle bei der Bindung von Rev an hnRNPs mit RGG-Motiven (hnRNP-A1, K, Q, R und U) spielt. Ferner konnte eine zelltyp-abhängige Interaktion von hnRNP-A1 mit dem Rev-Protein beobachtet werden. Der Einfluss der N-terminalen Region auf die Rev-abhängige Reporterprotein-Produktion war ebenfalls zelltypabhängig.

Aus den Daten dieser Arbeit lässt sich die Hypothese ableiten, dass die Interaktion des Rev-Proteins mit zellulären hnRNPs zur Regulation der Rev-abhängigen Genexpression beitragen kann. Zudem weisen diese Daten auf eine neue regulatorische Funktion des N-terminalen Bereichs von Rev hin.

6. Ausblick

In Affinitätschromatographie-Analysen konnten einige Rev-interagierende Faktoren (PABP1, PARP1, Nucleolin, NAP1L1 und Histon H2A) isoliert werden, die sich mittels Co-Immunpräzipitation nicht bestätigen ließen. Wie in Abschnitt 4.2.1 diskutiert, wäre die Verifizierung der Bindung von Rev an diese Proteine interessant, da sie in Zusammenhang mit HIV-1, HIV-1 Rev oder Rev-interagierenden Faktoren stehen.

Die Funktionsanalysen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, hatten stets die Bestimmung eines Proteins (*DsRed1* bzw. *p24*) als Messparameter. Um zu verstehen, wie die Proteine hnRNP-A1 und Q die Reporterprotein-Produktion bzw. die *p24*-Produktion stimulieren, müssen Untersuchungen auf der mRNA-Ebene durchgeführt werden. Hierbei lässt sich klären, ob diese Proteine das Spleißen, den mRNA Export oder die Stabilität der mRNA positiv beeinflussen.

Des Weiteren wäre es interessant zu untersuchen, ob die RGG-Motive der Proteine hnRNP-A1, K, Q, R und U für die Bindung an den Rev N-Terminus verantwortlich sind. Hierbei könnten Deletions- bzw. Punktmutationen der Arginin-reichen Domänen Aufschluss geben. Am Beispiel von hnRNP-A1 könnte die Bindung solcher Mutanten an Rev mittels Affinitätschromatographie analysiert werden (siehe auch 4.2.2).

Schließlich sollte analysiert werden, ob die Dimethylierung des RGG-Motifs im hnRNP-A1-Protein ausschlaggebend für die Unterdrückung der Interaktion von Rev mit hnRNP-A1 in HeLa-Zellen ist (siehe auch 4.4). HnRNP-A1 könnte aus HeLa-Zellen und Astrozyten mittels Immunpräzipitation isoliert und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie auf posttranslationale Modifikationen untersucht werden.

7. Verwendete Abkürzungen

ARM	Arginin rich motif
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CDC	Centers for Disease control
CCD	Charge coupled device
CD4	Cluster of Differentiation 4
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CMV	Cytomegalovirus
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CRM1	Exportin1
CTP	Cytosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Green Fluorescent Protein aus Aequorea victoria
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTLV	Human T-cell Leukemia Virus
hnRNP	Heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein
INS	Instabilitätselement
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LTR	Long Terminal Repeat
M2H	Mammalian Two Hybrid
MHC	Major Histocompatibility Complex

mRFP	monomeric Red Fluorescent Protein
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NES	Nuclear Export Signal
NIS	Diffusion Inhibitory Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonucleic Acid
RRE	Rev Response Element
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
Taq	Thermus aquaticus
TAR	Transactivation Response Element
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
Y2H	Yeast Two Hybrid
YFP	Yellow Fluorescent Protein

8. Literaturverzeichnis

- Afonina, E., Neumann, M., and Pavlakis, G. N. (1997). Preferential binding of poly(A)-binding protein 1 to an inhibitory RNA element in the human immunodeficiency virus type 1 gag mRNA. *J Biol Chem* 272(4), 2307-11.
- Afonina, E., Stauber, R., and Pavlakis, G. N. (1998). The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 273(21), 13015-21.
- Allemand, E., Guil, S., Myers, M., Moscat, J., Caceres, J. F., and Krainer, A. R. (2005). Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(10), 3605-10.
- Angelov, D., Bondarenko, V. A., Almagro, S., Menoni, H., Mongelard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V. M., Hamiche, A., Dimitrov, S., and Bouvet, P. (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *Embo J* 25(8), 1669-79.
- Arnold, M., Nath, A., Hauber, J., and Kehlenbach, R. H. (2006). Multiple importins function as nuclear transport receptors for the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem* 281(30), 20883-90.
- Arrigo, S., and Chen, I. S. Y. (1992 a). Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr and envy vol. pu 2 RNAs. *Genes and Dev* 5, 808-819.
- Askjaer, P., Jensen, T. H., Nilsson, J., Englmeier, L., and Kjems, J. (1998). The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* 273(50), 33414-22.
- Auer, M., Gremlich, H. U., Seifert, J. M., Daly, T. J., Parslow, T. G., Casari, G., and Gstach, H. (1994). Helix-loop-helix motif in HIV-1 Rev. *Biochemistry* 33(10), 2988-96.
- Bagasra, O., Khalili, K., Seshamma, T., Taylor, J. P., and Pomerantz, R. J. (1992). TAR-independent replication of human immunodeficiency virus type 1 in glial cells. *J Virol* 66(12), 7522-8.
- Barre-Sinoussi, F., Cherman, J.-C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vezinet, F., Rouzious, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Bedard, K. M., Daijogo, S., and Semler, B. L. (2007). A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *Embo J* 26(2), 459-67.
- Bevis, B. J., and Glick, B. S. (2002). Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* 20(1), 83-7.
- Bigner, D. D., Bigner, S. H., Ponten, J., Westermarck, B., Mahaley, M. S., Ruoslahti, E., Herschman, H., Eng, L. F., and Wikstrand, C. J. (1981). Heterogeneity of Genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 40(3), 201-29.
- Blanco, F. J., Hess, S., Pannell, L. K., Rizzo, N. W., and Tycko, R. (2001). Solid-state NMR data support a helix-loop-helix structural model for the N-terminal half of HIV-1 Rev in fibrillar form. *J Mol Biol* 313(4), 845-59.

- Bogerd, H. P., Echarri, A., Ross, T. M., and Cullen, B. R. (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.
- Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S., and Cullen, B. R. (1995). Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* 82(3), 485-94.
- Bomsztyk, K., Denisenko, O., and Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays* 26(6), 629-38.
- Bomsztyk, K., Van Seuning, I., Suzuki, H., Denisenko, O., and Ostrowski, J. (1997). Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein. *FEBS Lett* 403(2), 113-5.
- Bonnal, S., Pileur, F., Orsini, C., Parker, F., Pujol, F., Prats, A. C., and Vagner, S. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J Biol Chem* 280(6), 4144-53.
- Borggreffe, T., Wabl, M., Akhmedov, A. T., and Jessberger, R. (1998). A B-cell-specific DNA recombination complex. *J Biol Chem* 273(27), 17025-35.
- Brack-Werner, R. (1999). Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *Aids* 13(1), 1-22.
- Brack-Werner, R., Kleinschmidt, A., Ludvigsen, A., Mellert, W., Neumann, M., Herrmann, R., Khim, M. C. L., Burny, A., Müller-Lantzsch, N., Stavrou, D., and Erfle, V. (1992). Infection of human brain cells by HIV-1: restricted virus production in chronically infected human glial cell lines. *AIDS* 6(3), 273-285.
- Brady, J., and Kashanchi, F. (2005). Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology* 2, 69.
- Cartier, C., Sivard, P., Tranchat, C., Decimo, D., Desgranges, C., and Boyer, V. (1999). Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J Biol Chem* 274(27), 19434-40.
- Chiodi, F., Fuerstenberg, S., Gidlund, M., Asjo, B., and Fenyo, E. M. (1987). Infection of brain-derived cells with the human immunodeficiency virus. *J Virol* 61(4), 1244-7.
- Chiu, I. M., Yaniv, A., Dahlberg, J. E., Gazit, A., Skuntz, S. F., Tronick, S. R., and Aaronson, S. A. (1985). Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature* 317(6035), 366-8.
- Cullen, B. R. (1998a). HIV-1 auxiliary proteins: Making connections in a dying cell. *Cell* 93, 685-692.
- Cullen, B. R. (1998b). Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* 249(2), 203-10.
- D'Agostino, D., Felber, B. K., Harrison, J. E., and Pavlakis, G. N. (1992). The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. *Molecular and Cellular Biol* 12(3), 1375-1386.
- De Rijck, J., Vandekerckhove, L., Christ, F., and Debyser, Z. (2007). Lentiviral nuclear import: a complex interplay between virus and host. *Bioessays* 29(5), 441-51.

- Dreyfuss, G., Kim, V. N., and Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3), 195-205.
- Einhauer, A., and Jungbauer, A. (2001). The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods* 49(1-3), 455-65.
- Fang, J., Acheampong, E., Dave, R., Wang, F., Mukhtar, M., and Pomerantz, R. J. (2005). The RNA helicase DDX1 is involved in restricted HIV-1 Rev function in human astrocytes. *Virology* 336(2), 299-307.
- Fang, J., Kubota, S., and Pomerantz, R. J. (2002). A trans-dominant negative HIV type 1 Rev with intact domains of NLS/NOS and NES. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(10), 705-9.
- Fang, J., Kubota, S., Yang, B., Zhou, N., Zhang, H., Godbout, R., and Pomerantz, R. J. (2004). A DEAD box protein facilitates HIV-1 replication as a cellular co-factor of Rev. *Virology* 330(2), 471-80.
- Fankhauser, C., Izaurralde, E., Adachi, Y., Wingfield, P., and Laemmli, U. K. (1991). Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 Rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol Cell Biol* 11(5), 2567-75.
- Farjot, G., Sergeant, A., and Mikaelian, I. (1999). A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J Biol Chem* 274(24), 17309-17.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90(6), 1051-60.
- Fouts, D. E., True, H. L., Cengel, K. A., and Celander, D. W. (1997). Site-specific phosphorylation of the human immunodeficiency virus type-1 Rev protein accelerates formation of an efficient RNA-binding conformation. *Biochemistry* 36(43), 13256-62.
- Frankel, A. D., and Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Ann Rev Biochem* 67, 1-25.
- Freed, E. O. (2001). HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26(1-6), 13-33.
- Freed, E. O., and Martin, M. A. (2001). HIVs and their replication. 4th edition ed. In "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), pp. 1971-2041. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Fritz, C. C., Zapp, M. L., and Green, M. R. (1995). A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature* 376(6540), 530-3.
- Gallo, R. C., and Montagnier, L. (2003). The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med* 349(24), 2283-5.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., and 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., Sarin, P. S., and Gelmann, E. P. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Cell* 220, 865.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 397(6718), 436-41.

- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 112 (Pt 6), 761-72.
- Gloeckner, C. J., Boldt, K., Schumacher, A., Roepman, R., and Ueffing, M. (2007). A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics* 7(23), 4228-34.
- Gorry, P., Purcell, D., Howard, J., and McPhee, D. (1998). Restricted HIV-1 infection of human astrocytes: potential role of nef in the regulation of virus replication. *J Neurovirol* 4(4), 377-86.
- Gorry, P. R., Howard, J. L., Churchill, M. J., Anderson, J. L., Cunningham, A., Adrian, D., McPhee, D. A., and Purcell, D. F. (1999). Diminished production of human immunodeficiency virus type 1 in astrocytes results from inefficient translation of gag, env, and nef mRNAs despite efficient expression of Tat and Rev. *J Virol* 73(1), 352-61.
- Greene, W. C., and Peterlin, B. M. (2002). Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8(7), 673-80.
- Grosset, C., Chen, C. Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H., and Shyu, A. B. (2000). A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* 103(1), 29-40.
- Hagiwara, M. (2005). Alternative splicing: a new drug target of the post-genome era. *Biochim Biophys Acta* 1754(1-2), 324-31.
- Hakata, Y., Yamada, M., Mabuchi, N., and Shida, H. (2002). The carboxy-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 protein Rev has multiple roles in mediating CRM1-related Rev functions. *J Virol* 76(16), 8079-89.
- Hauck, S. M., Schoeffmann, S., Deeg, C. A., Gloeckner, C. J., Swiatek-de Lange, M., and Ueffing, M. (2005). Proteomic analysis of the porcine interphotoreceptor matrix. *Proteomics* 5(14), 3623-36.
- Havlin, R. H., Blanco, F. J., and Tycko, R. (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.
- He, G., and Margolis, D. M. (2002). Counterregulation of chromatin deacetylation and histone deacetylase occupancy at the integrated promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the HIV-1 repressor YY1 and HIV-1 activator Tat. *Mol Cell Biol* 22(9), 2965-73.
- Henderson, B. R., and Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* 274(5), 693-707.
- Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Muller, E., Schmitt, I., Stauber, R. H., Lottspeich, F., Jockusch, B. M., Scheer, U., Hauber, J., and Dabauvalle, M. C. (2001). Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol* 152(5), 895-910.
- Hope, T. J., Huang, X. J., McDonald, D., and Parslow, T. G. (1990). Steroid-receptor fusion of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: mapping cryptic functions of the arginine-rich motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(19), 7787-91.
- Jacquet, S., Mereau, A., Bilodeau, P. S., Damier, L., Stoltzfus, C. M., and Branlant, C. (2001). A second exon splicing silencer within human immunodeficiency

- virus type 1 tat exon 2 represses splicing of Tat mRNA and binds protein hnRNP H. *J Biol Chem* 276(44), 40464-75.
- Jeong, K. S., Nam, Y. S., and Venkatesan, S. (2000). Deletions near the N-terminus of HIV-1 Rev reduce RNA binding affinity and dominantly interfere with Rev function irrespective of the RNA target. *Arch Virol* 145(12), 2443-67.
- Kiledjian, M., and Dreyfuss, G. (1992). Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo J* 11(7), 2655-64.
- Kim, J. H., Hahm, B., Kim, Y. K., Choi, M., and Jang, S. K. (2000). Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J Mol Biol* 298(3), 395-405.
- Kim, J. H., Paek, K. Y., Ha, S. H., Cho, S., Choi, K., Kim, C. S., Ryu, S. H., and Jang, S. K. (2004). A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol Cell Biol* 24(18), 7878-90.
- Kim, S., Merrill, B. M., Rajpurohit, R., Kumar, A., Stone, K. L., Papov, V. V., Schneiders, J. M., Szer, W., Wilson, S. H., Paik, W. K., and Williams, K. R. (1997). Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* 36(17), 5185-92.
- Kim, T. D., Kim, J. S., Kim, J. H., Myung, J., Chae, H. D., Woo, K. C., Jang, S. K., Koh, D. S., and Kim, K. T. (2005). Rhythmic serotonin N-acetyltransferase mRNA degradation is essential for the maintenance of its circadian oscillation. *Mol Cell Biol* 25(8), 3232-46.
- Kim, V. N., and Dreyfuss, G. (2001). Nuclear mRNA binding proteins couple pre-mRNA splicing and post-splicing events. *Mol Cells* 12(1), 1-10.
- Kiss, A., Li, L., Gettemeier, T., and Venkatesh, L. K. (2003). Functional analysis of the interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev nuclear export signal with its cofactors. *Virology* 314(2), 591-600.
- Kjems, J., and Askjaer, P. (2000). Rev protein and its cellular partners. *Adv Pharmacol* 48, 251-98.
- Kramer-Hammerle, S., Ceccherini-Silberstein, F., Bickel, C., Wolff, H., Vincendeau, M., Werner, T., Erfle, V., and Brack-Werner, R. (2005a). Identification of a novel Rev-interacting cellular protein. *BMC Cell Biol* 6(1), 20.
- Kramer-Hammerle, S., Rothenaigner, I., Wolff, H., Bell, J. E., and Brack-Werner, R. (2005b). Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res* 111(2), 194-213.
- Kubota, S., Adachi, Y., Copeland, T. D., and Oroszlan, S. (1995). Binding of human prothymosin alpha to the leucine-motif/activation domains of HTLV-I Rex and HIV-1 Rev. *Eur J Biochem* 233(1), 48-54.
- Lam, W. C., Seifert, J. M., Amberger, F., Graf, C., Auer, M., and Millar, D. P. (1998). Structural dynamics of HIV-1 Rev and its complexes with RRE and 5S RNA. *Biochemistry* 37(7), 1800-9.
- Lee, P. T., Liao, P. C., Chang, W. C., and Tseng, J. T. (2007). Epidermal growth factor increases the interaction between nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K/poly(C) binding protein 1 complex to regulate the gastrin mRNA turnover. *Mol Biol Cell* 18(12), 5004-13.

- Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., and Oshiro, L. S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225(4664), 840-2.
- Lewis, S. M., Veyrier, A., Hosszu Ungureanu, N., Bonnal, S., Vagner, S., and Holcik, M. (2007). Subcellular relocalization of a trans-acting factor regulates XIAP IRES-dependent translation. *Mol Biol Cell* 18(4), 1302-11.
- Li, J., Liu, Y., Park, I. W., and He, J. J. (2002). Expression of exogenous Sam68, the 68-kilodalton SRC-associated protein in mitosis, is able to alleviate impaired Rev function in astrocytes. *J Virol* 76(9), 4526-35.
- Lichty, J. J., Malecki, J. L., Agnew, H. D., Michelson-Horowitz, D. J., and Tan, S. (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif* 41(1), 98-105.
- Ludwig, E., Silberstein, F. C.-., van Empel, J., Erfle, V., Neumann, M., and Brack-Werner, R. (1999). Diminished Rev-Mediated Stimulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protein Synthesis Is a Hallmark of Human Astrocytes. *J. Virol.* 73(10), 8279-8289.
- Luo, Y., Yu, H., and Peterlin, B. M. (1994). Cellular protein modulates effects of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J Virol* 68(6), 3850-6.
- Ma, J., Rong, L., Zhou, Y., Roy, B. B., Lu, J., Abrahamyan, L., Moulard, A. J., Pan, Q., and Liang, C. (2008). The requirement of the DEAD-box protein DDX24 for the packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology*.
- Makeyev, A. V., and Liebhaber, S. A. (2002). The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *Rna* 8(3), 265-78.
- Malim, M. H., Bohnlein, S., Hauber, J., and Cullen, B. R. (1989). Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell* 58(1), 205-14.
- Malim, M. H., McCarn, D. F., Tiley, L. S., and Cullen, B. R. (1991). Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J Virol* 65(8), 4248-54.
- Marin, O., Sarno, S., Boschetti, M., Pagano, M. A., Meggio, F., Ciminale, V., D'Agostino, D. M., and Pinna, L. A. (2000). Unique features of HIV-1 Rev protein phosphorylation by protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* 481(1), 63-7.
- Mattaj, I. W., and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265-306.
- Mäusbacher, N. (2006). Diplomarbeit. Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Mayeda, A., and Krainer, A. R. (1992). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68(2), 365-75.
- Meggio, F., D'Agostino, D. M., Ciminale, V., Chieco-Bianchi, L., and Pinna, L. A. (1996). Phosphorylation of HIV-1 Rev protein: implication of protein kinase CK2 and pro-directed kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 226(2), 547-54.
- Mellert, W., Kleinschmidt, A., Schmidt, J., Festl, H., Emler, S., Roth, W. K., and Erfle, V. (1990). Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1. *Aids* 4(6), 527-35.

- Michelotti, E. F., Michelotti, G. A., Aronsohn, A. I., and Levens, D. (1996). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol Cell Biol* 16(5), 2350-60.
- Mizutani, A., Fukuda, M., Ibata, K., Shiraishi, Y., and Mikoshiba, K. (2000). SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms. *J Biol Chem* 275(13), 9823-31.
- Modem, S., and Reddy, T. R. (2008). An anti-apoptotic protein, Hax-1, inhibits the HIV-1 rev function by altering its sub-cellular localization. *J Cell Physiol* 214(1), 14-9.
- Mongelard, F., and Bouvet, P. (2007). Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol* 17(2), 80-6.
- Mourelatos, Z., Abel, L., Yong, J., Kataoka, N., and Dreyfuss, G. (2001). SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *Embo J* 20(19), 5443-52.
- Najera, I., Krieg, M., and Karn, J. (1999). Synergistic stimulation of HIV-1 rev-dependent export of unspliced mRNA to the cytoplasm by hnRNP A1. *J Mol Biol* 285(5), 1951-64.
- Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A., and Mann, M. (1998). Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* 20(1), 46-50.
- Neumann, M., Afonina, E., Ceccherini-Silberstein, F., Schlicht, S., Erfle, V., Pavlakis, G. N., and Brack-Werner, R. (2001). Nucleocytoplasmic transport in human astrocytes: decreased nuclear uptake of the HIV Rev shuttle protein. *J Cell Sci* 114(Pt 9), 1717-29.
- Neumann, M., Felber, B. K., Kleinschmidt, A., Froese, B., Erfle, V., Pavlakis, G. N., and Brack-Werner, R. (1995). Restriction of human immunodeficiency virus type 1 production in a human astrocytoma cell line is associated with a cellular block in Rev function. *J Virol* 69(4), 2159-67.
- Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L. I., and Rosbash, M. (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.
- Ohagen, A., and Gabuzda, D. (2000). Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* 74(23), 11055-66.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Rucknagel, K. P., Schierhorn, A., Moritz, B., Huttelmaier, S., Flach, N., Handoko, L., and Wahle, E. (2006). Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *J Biol Chem* 281(16), 11115-25.
- Parent, M., Yung, T. M., Rancourt, A., Ho, E. L., Vispe, S., Suzuki-Matsuda, F., Uehara, A., Wada, T., Handa, H., and Satoh, M. S. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a negative regulator of HIV-1 transcription through competitive binding to TAR RNA with Tat-positive transcription elongation factor b (p-TEFb) complex. *J Biol Chem* 280(1), 448-57.
- Park, Y. J., and Luger, K. (2006). Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem Cell Biol* 84(4), 549-58.

- Peruzzi, F. (2006). The multiple functions of HIV-1 Tat: proliferation versus apoptosis. *Front Biosci* 11, 708-17.
- Pollard, A. J., Krainer, A. R., Robson, S. C., and Europe-Finner, G. N. (2002). Alternative splicing of the adenylyl cyclase stimulatory G-protein G alpha(s) is regulated by SF2/ASF and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1) and involves the use of an unusual TG 3'-splice Site. *J Biol Chem* 277(18), 15241-51.
- Popovic, M., Sarnagadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C. (1984 b). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and Pre-Aids. *Science* 224, 497-500.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24(3), 218-29.
- Quina, A. S., Buschbeck, M., and Di Croce, L. (2006). Chromatin structure and epigenetics. *Biochem Pharmacol* 72(11), 1563-9.
- Quivy, V., De Walque, S., and Van Lint, C. (2007). Chromatin-associated regulation of HIV-1 transcription: implications for the development of therapeutic strategies. *Subcell Biochem* 41, 371-96.
- Ragheb, J. A., Bressler, P., Daucher, M., Chiang, L., Chuah, M. K., Vandendriessche, T., and Morgan, R. A. (1995). Analysis of trans-dominant mutants of the HIV type 1 Rev protein for their ability to inhibit Rev function, HIV type 1 replication, and their use as anti-HIV gene therapeutics. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11(11), 1343-53.
- Reed, R., and Hurt, E. (2002). A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108(4), 523-31.
- Reed, R., and Magni, K. (2001). A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff. *Nat Cell Biol* 3(9), E201-4.
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., Learn, G. H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P. M., Wolinsky, S., and Korber, B. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288(5463), 55-6.
- Romig, H., Fackelmayer, F. O., Renz, A., Ramsperger, U., and Richter, A. (1992). Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *Embo J* 11(9), 3431-40.
- Rothenaigner, I., Kramer, S., Ziegler, M., Wolff, H., Kleinschmidt, A., and Brack-Werner, R. (2007). Long-term HIV-1 infection of neural progenitor populations. *Aids* 21(17), 2271-81.
- Roy, B. B., Hu, J., Guo, X., Russell, R. S., Guo, F., Kleiman, L., and Liang, C. (2006). Association of RNA helicase a with human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Biol Chem* 281(18), 12625-35.
- Ruhl, M., Himmelsbach, M., Bahr, G. M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G. K., Probst, H., Bevec, D., and 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.

- Schaeffer, E., Geleziunas, R., and Greene, W. C. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *J Virol* 75(6), 2993-3000.
- Schlapschy, M., Dommel, M. K., Hadian, K., Fogarasi, M., Korndorfer, I. P., and Skerra, A. (2004). The periplasmic E. coli chaperone Skp is a trimer in solution: biophysical and preliminary crystallographic characterization. *Biol Chem* 385(2), 137-43.
- Schmidt, T. G., and Skerra, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2(6), 1528-35.
- Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M. M., and Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(7), 473-83.
- Shnyreva, M., Schullery, D. S., Suzuki, H., Higaki, Y., and Bomsztyk, K. (2000). Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. *J Biol Chem* 275(20), 15498-503.
- Sierra, S., Kupfer, B., and Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* 34(4), 233-44.
- Stauber, R., Gaitanaris, G. A., and Pavlakis, G. N. (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.
- Stavrou, D., Bise, K., Groeneveld, J., Stocker, U., Kretzschmar, H. A., Keiditsch, E., and Mehraein, P. (1989). Antigenic heterogeneity of human brain tumors defined by monoclonal antibodies. *Anticancer Res* 9(6), 1489-96.
- Stavrou, D., Keiditsch, E., Schmidberger, F., Bise, K., Funke, I., Eisenmenger, W., Kurrle, R., Martin, B., and Stocker, U. (1987). Monoclonal antibodies against human astrocytomas and their reactivity pattern. *J Neurol Sci* 80(2-3), 205-20.
- Stoltzfus, C. M., and Madsen, J. M. (2006). Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing. *Curr HIV Res* 4(1), 43-55.
- Stutz, F., Izaurralde, E., Mattaj, I. W., and Rosbash, M. (1996). A role for nucleoporin FG repeat domains in export of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and RNA from the nucleus. *Mol Cell Biol* 16(12), 7144-50.
- Stutz, F., Neville, M., and Rosbash, M. (1995). Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 Rev protein in yeast. *Cell* 82(3), 495-506.
- Szebeni, A., Herrera, J. E., and Olson, M. O. (1995). Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* 34(25), 8037-42.
- Szebeni, A., Mehrotra, B., Baumann, A., Adam, S. A., Wingfield, P. T., and Olson, M. O. (1997). Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry* 36(13), 3941-9.
- Szebeni, A., and Olson, M. O. (1999). Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* 8(4), 905-12.
- Tange, T. O., Jensen, T. H., and Kjems, J. (1996). In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *J Biol Chem* 271(17), 10066-72.

- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60(5), 523-33.
- Thomas, S. L., Hauber, J., and Casari, G. (1997). Probing the structure of the HIV-1 Rev trans-activator protein by functional analysis. *Protein Eng* 10(2), 103-7.
- Thomas, S. L., Oft, M., Jaksche, H., Casari, G., Heger, P., Dobrovnik, M., Bevec, D., and Hauber, J. (1998). Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *J Virol* 72(4), 2935-44.
- Truant, R., and Cullen, B. R. (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.
- Urcuqui-Inchima, S., Castano, M. E., Hernandez-Verdun, D., St-Laurent, G., 3rd, and Kumar, A. (2006). Nuclear Factor 90, a cellular dsRNA binding protein inhibits the HIV Rev-export function. *Retrovirology* 3, 83.
- Valente, S. T., and Goff, S. P. (2006). Inhibition of HIV-1 gene expression by a fragment of hnRNP U. *Mol Cell* 23(4), 597-605.
- van Empel, J. (2000). Dissertation rer. nat., München Ludwig Maximilians Universität.
- Vardabasso, C., Manganaro, L., Lusic, M., Marcello, A., and Giacca, M. (2008). The histone chaperone protein Nucleosome Assembly Protein-1 (hNAP-1) binds HIV-1 Tat and promotes viral transcription. *Retrovirology* 5(1), 8.
- Venkatesh, L. K., and Chinnadurai, G. (1990). Mutants in a conserved region near the carboxy-terminus of HIV-1 Rev identify functionally important residues and exhibit a dominant negative phenotype. *Virology* 178(1), 327-30.
- Venkatesh, L. K., Gettemeier, T., and Chinnadurai, G. (2003). A nuclear Kinesin-like protein interacts with and stimulates the activity of the leucine-rich nuclear export signal of the human immunodeficiency virus type 1 rev protein. *J Virol* 77(13), 7236-43.
- Virag, L., and Szabo, C. (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54(3), 375-429.
- Wang, Z., Day, N., Trifillis, P., and Kiledjian, M. (1999). An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol Cell Biol* 19(7), 4552-60.
- Watts, N. R., Sackett, D. L., Ward, R. D., Miller, M. W., Wingfield, P. T., Stahl, S. S., and Steven, A. C. (2000). HIV-1 rev depolymerizes microtubules to form stable bilayered rings. *J Cell Biol* 150(2), 349-60.
- Wolff, H. (2003). Dissertation. Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Wolff, H., Brack-Werner, R., Neumann, M., Werner, T., and Schneider, R. (2003). Integrated functional and bioinformatics approach for the identification and experimental verification of RNA signals: application to HIV-1 INS. *Nucleic Acids Research* 31(11), 2839-2851.
- Wolff, H., Hadian, K., Ziegler, M., Weierich, C., Kramer-Hammerle, S., Kleinschmidt, A., Erfle, V., and Brack-Werner, R. (2006a). Analysis of the influence of subcellular localization of the HIV Rev protein on Rev-dependent gene expression by multi-fluorescence live-cell imaging. *Exp Cell Res* 312(4), 443-56.
- Wolff, H., Hartl, A., Eilken, H. M., Hadian, K., Ziegler, M., and Brack-Werner, R. (2006b). Live-cell assay for simultaneous monitoring of expression and interaction of proteins. *Biotechniques* 41(6), 688, 690, 692.

- Woolaway, K., Asai, K., Emili, A., and Cochrane, A. (2007). hnRNP E1 and E2 have distinct roles in modulating HIV-1 gene expression. *Retrovirology* 4, 28.
- Yang, J. P., Reddy, T. R., Truong, K. T., Suhasini, M., and Wong-Staal, F. (2002). Functional interaction of Sam68 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *Oncogene* 21(47), 7187-94.
- Yedavalli, V. S., Neuveut, C., Chi, Y. H., Kleiman, L., and Jeang, K. T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* 119(3), 381-92.
- Yugami, M., Kabe, Y., Yamaguchi, Y., Wada, T., and Handa, H. (2007). hnRNP-U enhances the expression of specific genes by stabilizing mRNA. *FEBS Lett* 581(1), 1-7.
- Zheng, Y. H., Yu, H. F., and Peterlin, B. M. (2003). Human p32 protein relieves a post-transcriptional block to HIV replication in murine cells. *Nat Cell Biol* 5(7), 611-8.
- Ziegler, M. (2006). Dissertation. Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Zlatanova, J., Seebart, C., and Tomschik, M. (2007). Nap1: taking a closer look at a juggler protein of extraordinary skills. *Faseb J* 21(7), 1294-310.
- Zolotukhin, A. S., and Felber, B. K. (1999). Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J Virol* 73(1), 120-7.

9. Danksagung

Frau Prof. Dr. Ruth Brack-Werner danke ich ganz besonders für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation, der Betreuung meiner Arbeit und den anregenden Diskussionen, die bedeutend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer, der sich bereit erklärt hat die Arbeit zu begutachten.

Ebenfalls ganz besonders danke ich Herrn Dr. Horst Wolff, der mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und beim Korrekturlesen der Arbeit eine große Hilfe war.

Herrn Daniel Nagel danke ich ganz herzlich als Kollege und guter Freund, der mir durch sein Praktikum, das Korrekturlesen der Arbeit und den vielen interessanten Diskussionen eine große Hilfe im letzten Drittel der Doktorarbeit war.

Frau Dr. Susanne Kramer möchte ich ebenfalls sehr herzlich danken, die als Kollegin und gute Freundin immer hilfsbereit mindestens ein offenes Ohr für mich hatte.

Frau Dr. Stefanie Hauck und Herrn Dr. Marius Ueffing möchte ich für die kompetente Durchführung der MALDI-TOF Massenspektrometrie Analysen und den vielen interessanten Diskussionen innerhalb der tollen Kollaboration danken.

Des Weiteren möchte ich Frau Ina Rothenaigner als jahrelange Weggefährtin im Labor und als gute Freundin für das gemeinsame Durchstehen danken.

Frau Edeltraud Vincendeau möchte ich sehr für das Korrekturlesen der Arbeit danken.

Zudem möchte ich mich bei allen restlichen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden des IMV für die Unterstützung danken. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Ursula Voll, Frau Hildegard Witte und dem Team der Spülküche, Frau Karin Eberl, Frau Anna Hauptkorn und Frau Ana Grenner bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern und meiner Schwester für die außerordentliche Unterstützung und Kraft, ohne die das Studium gar nicht möglich gewesen wäre.

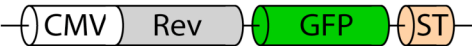



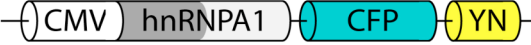
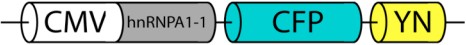
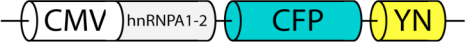
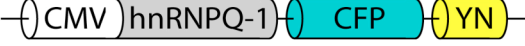
Mein allergrößter Dank gilt Frau Michelle Vincendeau, die mich privat, im Labor und beim Korrekturlesen der Arbeit stets unterstützt hat. Ihre Liebe und Geduld während des gesamten Studiums und der Doktorarbeit gab mir viel Kraft zum Durchhalten.

10. Anhang

10.1. In dieser Arbeit hergestellte Expressionskonstrukte

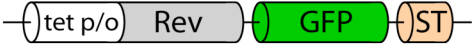

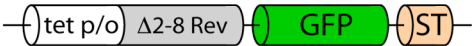

10.1.1. Eukaryotische Expressionsplasmide

Die im Folgenden aufgeführten eukaryotischen Expressionskonstrukte wurden in dieser Arbeit erstellt.

<u>Expressionsplasmid</u>	<u>Protein</u>
pCRevGFP-StrepTagII	
pCGFP-StrepTagII	
pCΔ2-8RevGFP	
pCΔ2-14RevGFP	
pChnRNPA1-CFP-YN	
pChnRNPA1(1. Teil)-CFP-YN	
pChnRNPA1(2. Teil)-CFP-YN	
pChnRNPQ-CFP-YN	

10.1.2. Prokaryotische Expressionsplasmide

Folgende prokaryotische Expressionskonstrukte wurden in dieser Arbeit generiert.

<u>Expressionsplasmid</u>	<u>Protein</u>
pASKIBA3(+)-RevGFP-StrepTagII	
pASKIBA3(+)-GFP-StrepTagII	
pASKIBA3(+)-2-8RevGFP-StrepTagII	
pASKIBA3(+)-2-14RevGFP-StrepTagII	

10.2. Publierte, Rev-interagierende Faktoren

In Tabelle 10.1 sind Einzelheiten zu den entsprechenden Rev-Bindungsanalysen zusammengefasst. Hierbei wurden hauptsächlich nur solche Untersuchungen berücksichtigt, die mit humanen zellulären Proteinen oder bakteriell hergestellten Proteinen durchgeführt wurden. Vereinzelt sind auch Interaktionsanalysen, die mit Hefe bzw. Xenopus Ausgangsmaterial durchgeführt wurden, gezeigt.

In dieser Tabelle sind die Methoden der Bindungsstudien, die Quelle, aus der die zellulären Proteine gewonnen wurden, der Bereich der Interaktion im Rev-Protein, der jeweilige Einfluss auf die Rev-Funktion und die jeweiligen Referenzen dargestellt.

Tabelle 10.1. (folgende Seiten): In der Literatur beschriebene Rev-Interaktionspartner

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse von mehreren Interaktionsuntersuchungen zusammengefasst. Die hier dargestellten Analysen berücksichtigen hauptsächlich Untersuchungen, die mit bakteriell hergestellten Proteinen oder humanen zellulären Proteinen durchgeführt wurden. Einige Daten, die mit Hefe bzw. Xenopus Material gewonnen wurden, sind ebenfalls gezeigt. Die Methoden der Interaktionsuntersuchungen, die Quelle, aus der die zelluläre Proteine gewonnen wurden, der Bereich der Interaktion im Rev-Protein, der Einfluss auf die Rev-Funktion und die Referenzen sind jeweils dargestellt. Grün hinterlegte Daten repräsentieren Interaktionen mit der NLS, gelb-orange hinterlegte Felder zeigen Interaktionen mit der NES und grau hinterlegte Felder Interaktionen mit anderen Bereichen.

Faktor	Interaktion mit Rev gezeigt durch	Quelle	Bereich der Interaktion im Rev-Protein	Einfluss auf Rev	Referenzen
B23	α -Rev Immunitätssäule; Rev-Säule; Sucrosegradient	HeLa	ARM	Kernlokalisation	Fankhauser, et al., 1991
	In vitro : Equilibrium Dialyse (NLS-Peptid + rekombinantes B23)	bakteriell hergestellt	NLS		Szebeni, et al., 1995
Importin-β	In vitro: Import assay + GST-Rev Säule	Human	NLS, da keine Interaktion mit M6	Kernimport	Truant und Cullen, 1999
	In vitro: GST-Rev Säule+ rekombinantes Importin- β	bakteriell hergestellt	NLS, da keine Interaktion mit M5		Henderson und Percipalle, 1997
	In vitro: GST-Rev Säule+ rekombinantes Importin- β	bakteriell hergestellt	NLS, da keine Interaktion mit M5		Arnold, et al., 2006
Importin-5	In vitro: GST-Rev Säule+ rekombinantes Importin-5	bakteriell hergestellt	NLS, da keine Interaktion mit M5	Kernimport	Arnold, et al., 2006
Importin-7	In vitro: GST-Rev Säule+ rekombinantes Importin-7	bakteriell hergestellt	NLS, da keine Interaktion mit M5	Kernimport	Arnold, et al., 2006
Transportin	In vitro: GST-Rev Säule+ rekombinantes Transportin	bakteriell hergestellt	NLS, da keine Interaktion mit M5	Kernimport	Arnold, et al., 2006
p32	In vitro: GST-p32 Säule + rekombinantes Rev-Protein	bakteriell hergestellt	basische Domäne (ARM)	mRNA Spleißing-Inhibitor	Tange et al., 1996
	Y2H	mouse cDNA Bibliothek	basische Domäne (ARM), da keine Interaktion mit M6		Lou et al., 1994
Risp	Y2H; M2H; Kolokalisation von Risp mit RevGFP	HEK293; HeLa	Aminosäuren 38-60	Inhibition der Rev-Funktion	Kramer-Hämmerle, et al., 2005
CRM1	Y2H	Hefe	NES, da keine Interaktion mit M10	Kernexport	Neville, et al., 1997
	M2H; In Vitro: GST-Rev Säule + rekombinantes CRM1	COS	NES, da keine Interaktion mit GST-M10		Bogerd, et al., 1998
	In vitro (Rev NES Peptid)	Kaninchen Retikulozyten	NES, da keine Interaktion mit M10		Fomerod, et al., 1997
	In vitro: mit rekombinantem Rev protein	bakteriell hergestellt			Askjaer, et al., 1998
	Rev/CRM1 Kolokalisation in den Nucleoli	293			Zolotukhin und Felber, 1999

Faktor	Interaktion mit Rev gezeigt durch	Quelle	Bereich der Interaktion im Rev-Protein	Einfluss auf Rev	Referenzen
eIF-5A	Cross-link mit NES Peptid; BIAcore mit α -NES-Antikörper	HeLa Kernlysat	NES	Kernexport	Ruhl, et al., 1993
	GST-RevNES	Xenopus	NES		Hofmann, et al., 2001
NLP-1	Y2H; M2H	HeLa	NES (Interaktion mit wtRev und NES; keine Interaktion mit M10)	Kernexport	Fajot, et al., 1999
Nup98; rNup98	Y2H (Rev mit GLFG-Wiederholung von Nup214)	---		Kernexport	Stutz, et al., 1996
	Koklokalisierung	HeLa Tat	NES (Δ NES-Rev konnte Nup98 nicht zu den Nukleoli rekrutieren)		Zolotukhin und Felber, 1999
	M2H	---	NES (Interaktion mit Rev59-98, jedoch nicht mit Rev59-73)		Kiss et al., 2003
Nup214; hCAN/Nup214	Y2H	---	NES (Interaktion mit wtRev und NES; keine Interaktion mit M10)	Kernexport	Fajot, et al., 1999
	Y2H (Rev mit XXFG-Wiederholung von hCAN/Nup214)	---			Stutz, et al., 1996
	Koklokalisierung	HeLa Tat	NES (Δ NES-Rev konnte Nup214 nicht zu den Nukleoli rekrutieren)		Zolotukhin und Felber, 1999
RIP/Rab1	Y2H; M2H; In vitro: GST-Rev bzw. GST-M10	bakteriell hergestellt	NES, da in allen Untersuchungen keine Interaktion mit M10	Kernexport	Bogert et al., 1995
	Y2H	---	NES, da keine Interaktion mit M10		Fritz et al., 1995
	Y2H (Rev mit XXFG-Wiederholung von hRIP/RAB1)	---			Stutz, et al., 1996
	Y2H mit wtRev und M10	---	NES, da keine Interaktion mit M10		Stutz, et al., 1996
Prothymosin α	M2H	---	NES (Interaktion mit Rev59-98, jedoch nicht mit Rev59-73)	Kernexport	Kiss et al., 2003
	Affinitätschromatographie	bakteriell hergestellt	NES-Peptid		Kubota et al., 1995
Sam68	IP: α -Sam68-HA bzw. α -Rev-Flag	293T	NES, da keine Interaktion mit M10	Kernexport	Li et al., 2002

Faktor	Interaktion mit Rev gezeigt durch	Quelle	Bereich der Interaktion im Rev-Protein	Einfluss auf Rev	Referenzen
Casein Kinase 2	Theoretisch durch Mutationsstudien	---	Helix 1 und 2	Phosphorylierung von Rev	Meggio et al., 2001
DDX1	M2H (mit Rev bzw. NIS-Region alleine); In vitro: GST-Rev und DDX1 bzw. GST-DDX1 und Rev; IP: α -Rev bzw. α -DDX1	HEK293	Aminosäuren 10-24	Stimulierung der Rev-RRE-Bindung und wichtig für die Rev-Lokalisierung	Fang et al., 2004
DDX3	Immunpräzipitation mit HA-DDX3 und RevGFP	HeLa	unbekannt	Beteiligt am CRM1-Export-Weg	Yedavalli et al., 2004
DDX24	Immunpräzipitation mit Rev-HisTag und DDX24 bzw. DDX24-FlagTag und Rev	293T	unbekannt	beteiligt an der Verpackung der RRE-RNA	Ma et al., 2008
Hax-1	Immunpräzipitation mit Hax-1-FlagTag und Rev	293T	unbekannt	Inhibition der Rev-abhängigen Genexpression	Modem und Reddy, 2008
NF90ctv	Immunpräzipitation mit NF90ctv-FlagTag und Rev	HeLa	unbekannt	Inhibition des Rev-abhängigen RNA-Transports	Urcuqui-Inchima et al., 2006
REBP	Y2H; Immunpräzipitation	BSC40 Zellen	Aminosäuren 59-98	Koaktivierung mit RIP/Rab	Venkatesh, et al., 2003
Tubulin	Rev-Tubulin Toroidbildung	---	Aminosäuren 1 bis 59	Depolymerisation und Destabilisierung von Mikrotubuli	Watts et al., 2000

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kamyar Hadian
Geburtstag: 20.09.1978
Geburtsort: Teheran/Iran
Nationalität: Deutsch
Adresse: Thalkirchner Str. 202
81371 München
Deutschland

Schulbildung:

1984 – 1986: Grundschule (1. und 2. Klasse) in Teheran/Iran
1986 – 1988: Grundschule (3. und 4. Klasse) an der Gebeleschule in München
1988 – 1989: 5. Klasse an der Stunz-Hauptschule in München
1989 – 1998: 5. – 13. Klasse am St.-Anna-Gymnasium in München
Juni 1998: Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

Studium:

1998 – 2003: Biologiestudium an der Technischen Universität München (TUM)
Diplomarbeit am Institut für Virologie des HelmholtzZentrum München
Thema: „Mutagenesestudien am HIV-1 Rev Protein und Etablierung einer neuen Methode zur Quantifizierung der intrazellulären Lokalisation fluoreszierender Proteine“
11/2003: Erlangung des Grades eines Diplom-Biologen
Seit 05/2004: Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) und Doktorarbeit am Institut für Virologie des HelmholtzZentrum München
Thema: „Interaktionen des HIV-1 Rev Regulationsfaktors mit zellulären RNA Bindungsproteinen“

Publikationen

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften:

- Schlapschy M., Dommel MK, **Hadian K**, Fogarasi M, Korndörfer IP und Skerra A
The periplasmic E. coli chaperone Skp is a trimer in solution: biophysical and preliminary crystallographic characterization.
Biological Chemistry, **2004**, 385(2):137-43
 - Wolff H¹, **Hadian K**¹, Ziegler M, Weierich C, Kramer-Hämmerle S, Kleinschmidt A, Erfle V und Brack-Werner R
Analysis of the influence of subcellular localization of the HIV Rev protein on Rev-dependent gene expression by multi-fluorescence live-cell imaging
Experimental Cell Research, **2006**, 312(4):443-456
- ¹ diese Autoren sind gleichgestellt
- Wolff H, Hartl A, Eilken HM, **Hadian K**, Ziegler M und Brack-Werner R
Live-cell assay for simultaneous monitoring of expression and interaction of proteins
BioTechniques, 2006, 41(6):688-692

Vorträge:

Hadian K, Wolff H, Hauck S, Ueffing M und Brack-Werner R
Identification of astrocytic Rev-interacting factors by StrepTagII/StrepTactin affinity chromatography.
Deutsche Gesellschaft für Virologie Tagung, München, **2006**

Posterpräsentationen:

- Wolff H, Demart S, **Hadian K**, Ziegler M, Erfle, V und Brack-Werner R
Mapping of sequences involved in nuclear localization of HIV Rev.
Deutsche Gesellschaft für Virologie Tagung, Tübingen, **2004**
- **Hadian K**, Wolff H, Hauck S, Ueffing M und Brack-Werner R
Isolation and identification of astrocytic Rev-interacting factors by StrepTagII affinity chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry.
Internationales FTICR-Symposium, München, **2006**
- **Hadian K**, Wolff H, Ziegler M, Weierich C, Kramer S, Kleinschmidt A und Brack-Werner R
Analysis of the influence of subcellular localization of the HIV Rev protein on Rev-dependent gene expression by multi-fluorescent live-cell imaging.
European AIDS Clinical Society Meeting, Madrid, **2007**
- Vincendeau M, Kramer S, **Hadian K**, Kremmer E, Leib-Mösch C und Brack-Werner R
Risp proteins may contribute to cellular control of HIV-1
Deutsche Gesellschaft für Virologie Tagung, Heidelberg, **2008**

Erklärung

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

München, den

Kamyar Hadian