

*Untersuchungen der regulatorischen Eigenschaften der HIV-1  
Proteine Rev und Tat in humanen Astrozyten*

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

vorgelegt von  
Jutta van Empel

Mai 2000

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Lutz Gürtler

2. Berichterstatter: PD Dr. Ruth Brack-Werner

Tag der Einreichung der Arbeit an der Fakultät: 04.05.2000

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2000



*meiner Mutter*

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>Klassifikation und Morphologie von HIV</i> .....	2
1.1.1. Klassifikation .....	2
1.1.2. Der Aufbau des Viruspartikels und seines Genoms .....	2
1.1.2.1. Das Virus und seine strukturellen Komponenten.....	2
1.1.2.2. Die regulatorischen Proteine .....	4
1.1.2.2.1. Tat (transactivator of transcription) .....	5
1.1.2.2.2. Rev (regulator of expression of virion proteins).....	8
1.1.2.3. Die akzessorischen Proteine.....	13
1.2. <i>Der Replikationszyklus von HIV</i> .....	15
1.3. <i>Die HIV-Infektion des zentralen Nervensystems</i> .....	17
1.3.1. Symptomatik und Infektionsweg .....	17
1.3.2. Effekte von Tat auf die Pathogenese der HIV-Infektion im ZNS .....	18
1.3.3. Die HIV-Infektion von humanen Astrozyten .....	19
1.3.4. Die Replikation von HIV in humanen Astrozyten.....	19
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>22</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
3.1. <i>Transiente Transfektionen von Zelllinien</i> .....	23
3.1.1. Durchführung von Transfektionen eukaryotischer Zelllinien.....	23
3.1.2. Für die Transfektionen verwendete Plasmide.....	25
3.2. <i>Die Rev-abhängige Transaktivierung der Expression des Reportergens cat in humanen Astrozyten</i> ... 28	
3.2.1. Optimierung der Transfektionsbedingungen .....	29
3.2.2. Die Rev-abhängige Transaktivierung der Expression des Reportergens cat ist in humanen Astrozytomzelllinien vermindert .....	33
3.2.3. Die Lokalisation von RevM5.....	35
3.2.4. Der Einfluß von Rev auf einen unabhängigen Promotor.....	38
3.3. <i>Die Funktion von Tat in humanen Astrozyten</i> .....	39
3.3.1. Die Transaktivierung der HIV-LTR durch Tat.....	39
3.3.2. Der Einfluß von Tat auf einen unabhängigen Promotor.....	42
3.3.3. Die Funktion von Tat an der HIV-LTR im Kontext von Fusionsproteinen .....	43
3.4. <i>Die Bindung von Rev an seine Ziel-RNS in humanen Astrozyten</i> .....	44
3.4.1. Ein in vivo System zur Prüfung der Rev/RNS-Bindung in Zelllinien.....	44
3.4.2. Rev bindet in humanen Astrozyten an seine Ziel-RNS SLIIB .....	47
3.4.3. Die Lokalisation von Rev und TatRev in humanen Astrozyten .....	50
3.4.4. Ein Vergleich zur Quantifizierung des Bindungsverhaltens von Rev .....	54

3.4.5.	Der Bindungstest in der Astrozytomzelllinie 85HG66: ein Sonderfall?.....	56
3.4.6.	Die Lokalisation von TatRev in 85HG66.....	61
3.5.	<i>Die Bindung von Rev an SLIIB kann spezifisch gehemmt werden</i> .....	63
3.5.1.	Die Inhibition der Rev/RNS-Bindung durch RevM10BL.....	64
3.5.2.	Die Inhibition der Rev/RNS-Bindung mit wtRev.....	65
3.5.3.	Die Inhibition der Bindung mit hohem Kompetitorüberschuß.....	69
3.5.4.	Die Inhibition der Rev/RNS-Bindung durch RNS.....	70
3.6.	<i>Die Oligomerisierung von Rev in humanen Astrozyten</i> .....	72
3.6.1.	Ein in vivo System zur Prüfung der Rev-Rev Oligomerisierung in Zelllinien.....	72
3.6.2.	Rev oligomerisiert in humanen Astrozyten.....	72
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>78</b>
4.1.	<i>Die Rev-Transaktivierung</i> .....	78
4.2.	<i>Die Bindung von Rev an die RNS</i> .....	82
4.2.1.	Ein in vivo-System.....	82
4.2.2.	Rev bindet in humanen Astrozyten effizient an seine Ziel-RNS.....	83
4.2.2.1.	Die Bindung von Rev an SLIIB in der humanen Astrozytomzelllinie 85HG66.....	83
4.2.2.2.	Die Hemmung der Bindung durch verschiedene Kompetitoren.....	86
4.3.	<i>Die Oligomerisierung von Rev</i> .....	91
4.4.	<i>Ein Modell zur verminderten Rev-Transaktivierung in Astrozyten unter Einbeziehung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten</i> .....	92
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>96</b>
<b>6.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>97</b>
6.1.	<i>Materialien und Bezugsquellen</i> .....	97
6.1.1.	Zelllinien.....	97
6.1.2.	Plasmide.....	97
6.1.3.	Antikörper.....	100
6.1.4.	Chemikalien.....	100
6.1.5.	Puffer und Lösungen.....	102
6.1.6.	Verwendete Kits.....	103
6.1.7.	Medien.....	104
6.2.	<i>Methoden</i> .....	105
6.2.1.	Allgemeine Zellkulturtechniken.....	105
6.2.1.1.	Kultivierung adhärenter Zellen und Zellzahlbestimmung.....	105
6.2.1.2.	Mykoplasmenfärbung und Behandlung der Zellen bei Mykoplasmenbefall.....	105
6.2.1.3.	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	106

6.2.1.4.	Transiente Transfektion adhärenter eukaryotischer Zellen.....	106
6.2.1.4.1.	Die CaPO <sub>4</sub> -Präzipitation .....	106
6.2.1.4.2.	Das FuGENE™6-Transfektionsreagenz .....	108
6.2.2.	Molekularbiologische Standardmethoden .....	108
6.2.2.1.	Ligation von DNS-Stücken mit „sticky ends“ .....	109
6.2.2.2.	Transformation von E. coli mit Plasmid-DNS.....	109
6.2.2.3.	Isolierung von Plasmiden aus E. coli .....	110
6.2.2.4.	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	111
6.2.2.5.	Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	112
6.2.2.6.	Sequenzierung von DNS-Molekülen .....	112
6.2.3.	Biochemische und immunologische Methoden.....	113
6.2.3.1.	Bestimmung der Gesamtproteinmenge von Zellysaten .....	113
6.2.3.2.	Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Zellysaten .....	114
6.2.3.3.	Bestimmung der CAT-Menge in Zellysaten (CAT-ELISA).....	115
6.2.3.4.	Bestimmung der CAT-Aktivität (enzymatischer CAT-Test).....	116
6.2.3.5.	Indirekte Immunfluoreszenz .....	118
6.2.4.	Computeranalytik und Software .....	119
6.2.4.1.	Statistische Analysen .....	119
6.2.4.2.	Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen.....	120
6.2.4.3.	Mikroskopie und Auswertung der Lokalisationsstudien.....	120
6.2.4.4.	Sonstiges .....	120
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>124</b>





## 1. EINLEITUNG

### *HIV und AIDS*

1981 wurde die Immunschwäche AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) zum ersten Mal beschrieben. Das humane Immunschwäche Virus (HIV) wurde 1983 unabhängig von Robert Gallo am National Cancer Institute in Bethesda als HTLV-III und von Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris als LAV isoliert und beschrieben (Gallo, R. C. et al., 1983) (Barre-Sinoussi, F. et al., 1983). 1984 wurde das Virus mit dem Krankheitsbild AIDS assoziiert. Seit 1986 bezeichnet man es als „HIV“. Man unterscheidet HIV-1 und HIV-2, wobei HIV-1 hauptsächlich für die globale Ausbreitung von AIDS verantwortlich ist, da es einen rascheren Krankheitsverlauf verursacht als HIV-2. HIV-2 wurde 1986 entdeckt und ist hauptsächlich in Westafrika verbreitet (Clavel, F. et al., 1986).

Das Virus ist vermutlich in mehreren unabhängigen Ereignissen vom Affen auf den Menschen übertragen worden. Als Ursprung für HIV-2 wurde schon 1989 aufgrund der Sequenzhomologie das Affen-Retrovirus SIV<sub>sm</sub> beschrieben (Hirsch, V. M. et al., 1989). Erst kürzlich wurde dagegen als primäres Reservoir von HIV-1 eine afrikanische Unterart des Schimpansen, *Pan troglodytes troglodytes*, dokumentiert (Gao, F. et al., 1999). Demnach haben drei unabhängige Ereignisse das Virus SIV<sub>cpz</sub> des Schimpansen in den Menschen eingebracht und führten zu den HIV-1 Gruppen M, N und O.

Nach Angaben der WHO sind seit dem Ausbruch der Epidemie weltweit mindestens 50 Millionen Menschen mit HIV infiziert worden, etwa 90% davon in Entwicklungsländern. Nach der Infektion kann eine mehrere Jahre dauernde klinische Latenzphase anschließen, während derer das Immunsystem und die Virusproduktion sich das Gleichgewicht halten. In dieser symptomfreien Phase werden etwa  $1-2 \times 10^9$  Lymphozyten/Tag durch das Virus zerstört, können jedoch vom Körper regeneriert werden. Etwa ebensoviele neue Viren werden pro Tag produziert (McCune, J. M., 1995). Beim Übergang in die symptomatische Phase bricht das Immunsystem zusammen, da die Anzahl der CD4-positiven Blutzellen sinkt, wohingegen die Virusproduktion steigt. Durch die einsetzende Immunschwäche kommt es vermehrt zu opportunistischen Infektionen und Tumoren, die letztlich zum Tod führen. 1999 starben über 2,6 Millionen Menschen weltweit an AIDS, rund 400 000 mehr als 1998 (Statistik der WHO zum Welt-AIDS-Tag am 1.12.1999).

Durch die Entwicklung von verschiedensten Medikamenten und Kombinationstherapien kann inzwischen der Ausbruch von AIDS erheblich verzögert werden. Die Therapie führt jedoch nicht zu einer Eliminierung des Virus in den infizierten Personen. Darüber hinaus treten aufgrund von Mutationen des Virus und der dadurch bedingten Variabilität immer wieder Resistenzen gegen die Medikamente auf. Die Entwicklung eines Impfstoffes ist bisher noch nicht abzusehen.

## 1.1. Klassifikation und Morphologie von HIV

### 1.1.1. Klassifikation

Die Retroviren werden in drei Unterfamilien eingeteilt. Man unterscheidet Onkoviren, Spumaviren und Lentiviren, wobei zu letzteren auch HIV gezählt wird (Modrow, S. und Falke, D., 1997). Retroviren kommen überwiegend in Wirbeltieren vor und können verschiedene Krankheitsbilder auslösen, die von harmlosen Infektionen über Tumorerkrankungen bis hin zu Immundefizienzen und neurologischen Defekten reichen (Modrow, S. und Falke, D., 1997). Als erstes Retrovirus wurde 1911 das Rous-Sarkom-Virus beschrieben, ein Tumovirus des Huhns. Retroviren besitzen ein RNS-Genom, das nach der Infektion des Wirts von der reversen Transkriptase, die spezifisch bei Retroviren vorkommt, in eine DNS umgeschrieben wird. Aus diesem Sachverhalt leitet sich auch der Name für die Viren ab, von *lat. retro* = rückwärts, da diese Reihenfolge dem Informationsfluß von DNS zu RNS zum Protein entgegengesetzt ist.

Lentiviren sind exogene, nicht-onkogene Viren, die mit dem Immunsystem und dem zentralen Nervensystem assoziiert werden und sich durch einen schleichenden Krankheitsverlauf mit langer Latenzzeit im Wirt auszeichnen. Neben HIV gibt es auch Immundefizienzviren des Affen (SIV), der Katze (FIV) und des Rindes (BIV). Darüber hinaus gehören zu den Lentiviren noch das Virus der infektiösen Anemie der Pferde (EIAV) und das Arthritis-Encephalitis-Virus der Ziege (CAEV).

### 1.1.2. Der Aufbau des Viruspartikels und seines Genoms

#### 1.1.2.1. Das Virus und seine strukturellen Komponenten

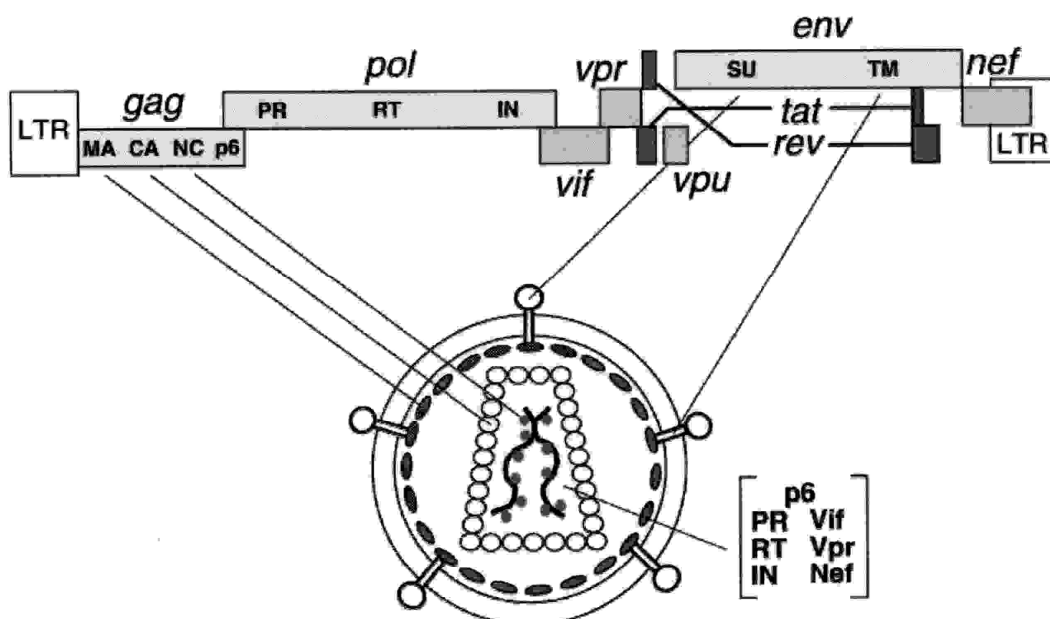


Abbildung 1 verdeutlicht den Aufbau des viralen Genoms und die sich daraus ergebende Struktur des Viruspartikels. HIV-1 ist ein sog. komplexes Retrovirus, das auch für akzessorische Proteine kodiert, die andere Retroviren nicht besitzen (Tang, H. et al., 1999). HIV besitzt ein RNS-Genom von etwa 9,2 kb Länge, das in Plus-Strang-Orientierung vorliegt und auf dem sich neun offene Leserahmen (ORFs) befinden. Sie kodieren für insgesamt 15 virale Proteine (zusammengefaßt in (Frankel, A. D. und Young, J. A., 1998)). Das Genom wird an beiden Seiten von den „long terminal repeats“ (LTRs) flankiert, wobei der 5'-LTR den viralen Promotor darstellt. Der 3'-LTR terminiert die Transkription.

Drei der ORFs sind die für alle Retroviren typischen Gene *gag*, *pol* und *env*. *Gag* und *pol* werden als Proteinvorläufer translatiert und dann durch die virale Protease enzymatisch prozessiert. Aus *gag* ergeben sich vier strukturelle Komponenten des Virions, das Matrixprotein (MA, p17), das Kapsidprotein (CA, p24), das Nukleokapsidprotein (NC, p7) und das auch „Verbindungsprotein“ genannte p6. *Env* kodiert für das Oberflächenprotein (SU, gp120) und das Transmembranprotein (TM, gp41) der Virushülle. Das Vorläuferprotein gp160 wird im Golgi-Apparat zu gp120 und gp41 prozessiert (McCune, J. et al., 1988). *Pol* kodiert für die enzymatischen Komponenten des Virus, die Protease (PR), die reverse Transkriptase (RT) und die Integrase (IN). Die weiteren sechs ORFs kodieren für zwei regulatorische und vier akzessorische Proteine (Kap. 1.1.2.2. und 1.1.2.3.)

Damit ergibt sich folgender Aufbau der Viruspartikel: Im Inneren des Virions, das einen Durchmesser von etwa 110 nm hat, befindet sich das konische Kapsid. Es enthält zwei identische Kopien des RNS-Genoms, die enzymatischen Viruskomponenten PR, RT und IN, die akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Nef (Abb. 1 und Kap. 1.1.2.1.) sowie p6. Das Prolinreiche p6 ist wichtig für die effiziente Virusfreisetzung und Verpackung von Pol-Proteinen ins Virion (Dettenhofer, M. und Yu, X. F., 1999) sowie die Inkorporation von Vpr (Bachand, F. et al., 1999) (Selig, L. et al., 1999). Das Nukleokapsidprotein enthält zwei Zinkfinger motive zur Bindung von Nukleinsäuren und liegt in Assoziation mit der RNS vor. Das Kapsid wird aus etwa 2000 Molekülen CA gebildet.

Das Matrix-Protein verbindet das Kapsid mit der Hülle. Es ist N-terminal myristyliert und führt vor dem Zusammenbau der neuen Viruspartikel die Gag-Vorläufer zur Zellmembran. Die Virushülle wird beim Ausknospen des Virions aus der Membran der Wirtszelle gebildet. Dort sind bereits die beiden Glykoproteine gp120 und gp41 eingelagert. Gp120 interagiert bei der Infektion mit dem CD4-Rezeptor und dem Korezeptor der Wirtszelle (vgl. Kap. 1.2.).

**Abb. 1 (vorhergehende Seite):** Der genomische und morphologische Aufbau von HIV. Unten rechts sind die Proteine angegeben, die zusammen mit den beiden Kopien des RNS-Genoms in das Virion verpackt werden. MA – Matrixprotein, CA – Kapsidprotein, NC – Nukleokapsidprotein, PR – Protease, RT – Reverse Transkriptase, IN – Integrase, SU – Oberflächenprotein, TM – Transmembranprotein. Die Abbildung wurde Frankel et al. entnommen (Frankel, A. D. und Young, J. A., 1998).

Das Glykoprotein gp120 besitzt fünf hypervariable Regionen V1 bis V5, die es dem Virus durch ständige Veränderungen ermöglichen, letztlich der Immunantwort des Wirts zu entgehen. Gp41 ist ein Transmembranprotein, dient der Verankerung von gp120 und fusioniert die Virusmit der Zellmembran (vgl. Kap. 1.2.).

Diese Angaben wurden, wenn nicht anders vermerkt, aus (Frankel, A. D. und Young, J. A., 1998) (Barbosa, P. und Kneass, Z., 1998) (Goto, T. et al., 1998), (Romano, G. et al., 1998) und (Fields, B. N. und Knipe, D. M., 1996) entnommen.

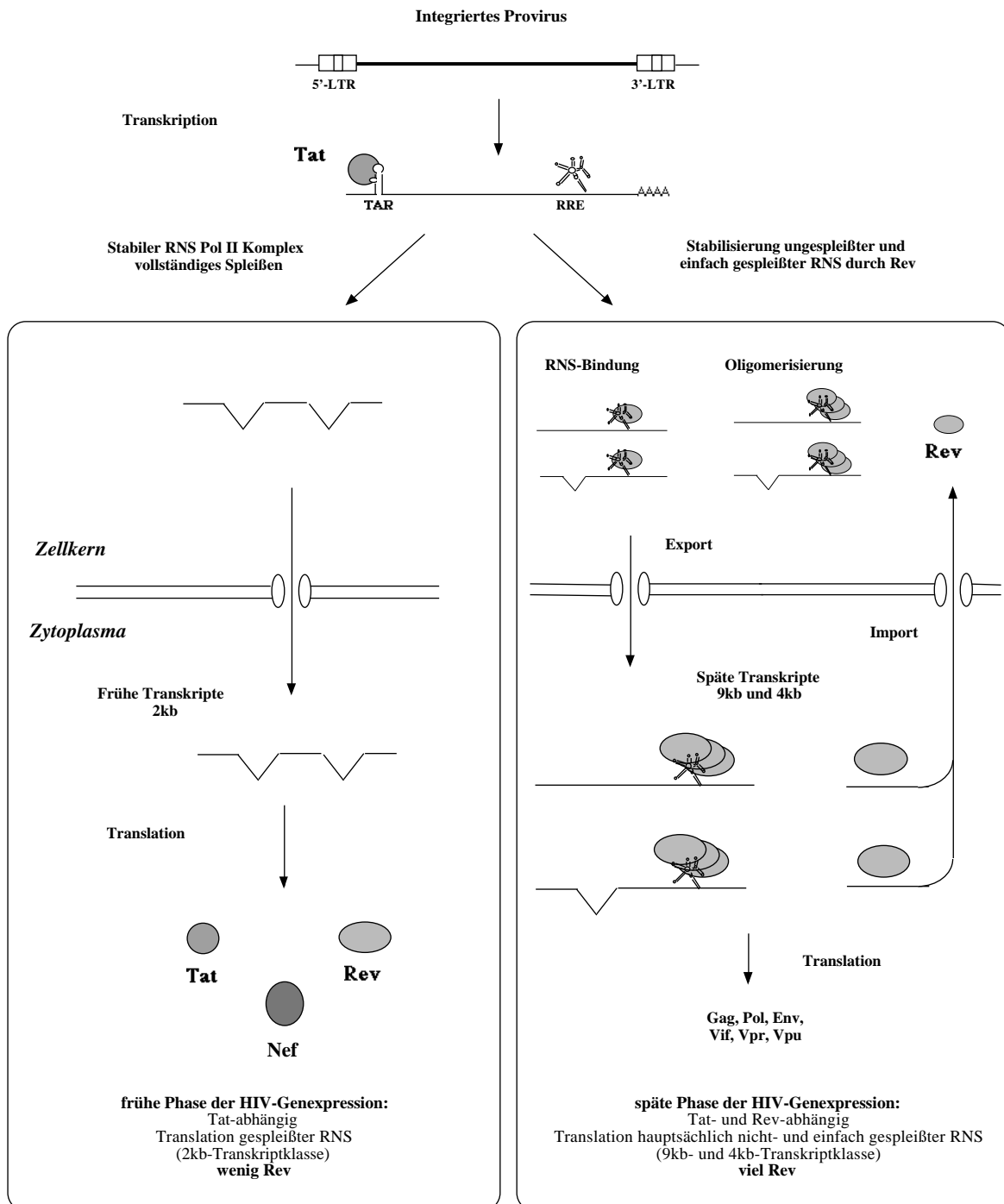
#### *1.1.2.2. Die regulatorischen Proteine*

HIV-1 kodiert für die beiden regulatorischen Proteine Tat und Rev, die Einfluß auf die virale Genexpression nehmen. Tat ist ein genereller Transkriptionsaktivator, während Rev posttranskriptionell die Synthese der viralen Strukturproteine stimuliert. Tat und Rev werden an dieser Stelle ausführlich besprochen, da sie in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle spielen. Die Funktionsweisen der beiden Proteine werden zunächst in Abbildung 2 zusammengefaßt, auf die dann im weiteren Bezug genommen werden kann.

Die Abbildung unterscheidet in die frühe und die späte Phase der HIV-Genexpression. In der frühen Phase ist noch wenig Rev in den Zellen vorhanden. Die Transkription wird durch Tat stimuliert, die entstandenen Transkripte werden vollständig gespleißt und dann zur Translation ins Zytoplasma transportiert. In der späten Phase ist viel Rev vorhanden, die Transkripte werden aufgrund der Bindung durch das Rev-Protein stabilisiert und es werden auch ungespleißte und einfach gespleißte Transkripte ins Zytoplasma transportiert, die für die HIV-Strukturproteine kodieren. Ungespleißte RNS dient darüber hinaus als Genom für neue Virionen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden eine Reihe von *in vivo* Experimenten zur Funktion der regulatorischen Proteine besprochen. Der Begriff *in vivo* wird in diesem Zusammenhang definiert, um Experimente in Zelllinien gegen rein biochemische *in vitro* Ansätze wie Immunpräzipitationen oder „gel-shift“ Analysen abzugrenzen, die keinen Bezug mehr zu lebenden Zellen haben.

**Abb. 2 (nächste Seite):** Die Abbildung faßt die Regulation der HIV-Genexpression durch die viralen Regulatorproteine Tat und Rev zusammen. Beide binden an Sekundärstrukturen in der RNS. Tat transaktiviert die Transkription, Rev reguliert posttranskriptionell. Die vermehrte Anwesenheit von Rev vermittelt den Übergang in die späte Phase der HIV-Genexpression. TAR - Trans-activating response element, RRE - Rev responsive element, LTR - long terminal repeat. Zu Einzelheiten vergleiche Text.



### 1.1.2.2.1. Tat (transactivator of transcription)

#### Struktureller Aufbau und Einfluß auf die HIV-Transkription

Das Tat-Protein ist ein genereller Aktivator der HIV-Transkription. HIV-1 Tat besteht aus 101 AAs, die auf zwei Exons kodiert werden (Exon 1 entspricht AAs 1-72). Eine Variante von Tat aus einem Laborstamm von HIV ist das 86 AAs Tat. Es wurde für viele Studien eingesetzt und ist funktionell (Rana, T. M. und Jeang, K. T., 1999). Die verkürzte Form wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

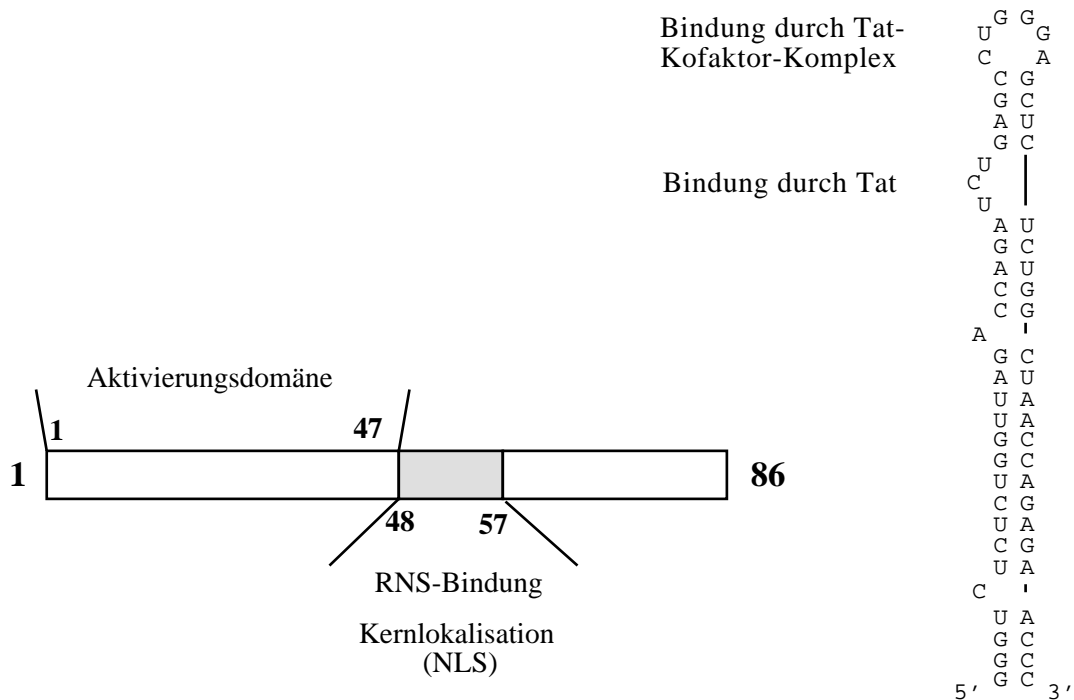
Tat bindet im Gegensatz zu den meisten anderen bekannten Transkriptions-Aktivatoren nicht eine DNS-, sondern eine RNS-Struktur, die sog. TAR (Trans-activating response element). Die 60 Nukleotide lange stem-loop-Struktur in der R-Region der LTR befindet sich am 5'-Ende eines jeden wachsenden HIV-Transkriptes (vgl. Abb. 2).

Der strukturelle Aufbau von Tat und TAR ist in Abbildung 3 zusammengefaßt. Das Tat-Protein enthält zwei funktionelle Domänen. Die N-terminalen Aminosäuren bis einschließlich 47 werden als Aktivierungsdomäne bezeichnet; fusioniert man sie an ein heterologes RNS-Bindeprotein, so erhält man volle Aktivität (Selby, M. J. und Peterlin, B. M., 1990). Aminosäuren 48-57 bilden eine basische Region, die die Bindung an die RNS vermittelt und das nukleäre/nukleoläre Lokalisationssignal enthält (zusammengefaßt in (Rana, T. M. und Jeang, K. T., 1999) (Kingsman, S. M. und Kingsman, A. J., 1996), Abb. 3). Die Lokalisation von Tat im Zellkern wurde unter anderem anhand von TatGFP-Fusionsproteinen in lebenden Zellen bestätigt (Ludwig, E. et al., 1999) (Stauber, R. H. und Pavlakis, G. N., 1998).

Die hauptsächliche Aufgabe von Tat besteht darin, die Prozessivität der RNS-PolymeraseII (RNS-PII) zu steigern. Dazu rekrutiert es eine Reihe von zellulären Faktoren an den LTR-Promotor und nimmt hauptsächlich auf die Elongation der Transkription Einfluß. Folgendes Modell wird dazu diskutiert (zusammengefaßt in (Jones, K. A., 1997) und (Yankulov, K. und Bentley, D., 1998)): Tat bindet an die „UCU“ einzelsträngige Ausbuchtung innerhalb der TAR (Abb. 3). Die Bindung von zellulärem Cyclin T an die Tat-Aktivierungsdomäne stabilisiert die Tat/TAR-Bindung (Wei, P. et al., 1998). Cyclin T bindet darüber hinaus die Kinase Cdk9, die den CTD-Schwanz der RNS-PolymeraseII phosphoryliert und die Polymerase in die II0-Isoform überführt. Diese Form vermittelt eine produktive Elongation im Gegensatz zu einer abortiven Elongation durch die hypophosphorylierte Form IIA. Der Komplex CyclinT–Cdk9 wird auch als p-TEFb bezeichnet (Zhu, Y. et al., 1997) (Fujinaga, K. et al., 1998). Mancebo et al. konnten zeigen, daß die Inhibition der Kinaseaktivität von Cdk9 die Tat-Funktion unterbindet (Mancebo, H. S. et al., 1997). Darüber hinaus ist Tat in Maus-Zellen, die eine Variante des Cyclins enthalten, nicht aktiv; die Funktion kann jedoch von humanem Cyclin komplementiert werden (Chen, D. et al., 1999).

Ein weiterer Kinase-Komplex, für den eine Interaktion mit Tat beschrieben wurde, ist TFIIH (Cujec, T. P. et al., 1997). Die Aktivierung der RNS-PII durch Phosphorylierung des CTD-Schwanzes findet nach dem schon für p-TEFb beschriebenen Prinzip statt, jedoch findet man TFIIH im Gegensatz zu p-TEFb bereits im Prä-Initiations-Komplex am Promotor. Beide Komplexe sind also zu unterschiedlichen Zeiten aktiv, die Einzelkomponenten können einander nicht ersetzen (Yankulov, K. und Bentley, D., 1998). Der genaue Mechanismus der Aktivierung ist noch nicht bekannt. Eine Zusammenfassung bietet (Rana, T. M. und Jeang, K. T., 1999).

Für stimulierte T-Lymphozyten und insbesondere für Gliazellen wurde eine TAR-unabhängige Transaktivierung des LTR-Promotors durch Tat beschrieben (Yang, L. et al., 1997) (Taylor, J. P. und Khalili, K., 1994) (Niikura, M. et al., 1996). Sie ist vermutlich auf eine Aktivierung der Transkriptions-Initiation zurückzuführen und wird mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in Verbindung gebracht (Taylor, J. P. et al., 1995).



**Abb. 3:** Der strukturelle Aufbau von HIV-1 Tat und seiner RNS-Zielsequenz TAR (Trans-activating response element).

### Extrazelluläres Tat

Tat kann von infizierten Zellen sezerniert werden (Goldstein, G., 1996) (Ensoli, B. et al., 1993). Extrazellulärem Tat werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. So kann es auch von nicht-infizierten Zellen aufgenommen werden, in deren Zellkern gelangen und dort die Expression zellulärer Gene transaktivieren. Es wurde eine Stimulation des Kollagen- und des Fibronectin-Promotors durch Tat beschrieben (Taylor, J. P. et al., 1992) sowie eine Aktivierung des Tumor Nekrose Faktors (TNF) und verschiedener Interleukine (zusammengefaßt in (Goldstein, G., 1996)). Auch die Rolle von exogenem Tat als Cytotoxin für nicht-infizierte T-Zellen und Neuronen wird diskutiert ((Li, C. J. et al., 1995) (Kruman, II et al., 1998), zusammengefaßt in (Rubartelli, A. et al., 1998)).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß lösliches Tat schon sehr früh in der Infektion immunsuppressive Eigenschaften aufweist (Cohen, S. S. et al., 1999). Indem es toxisch auf Makrophagen wirkt, vermindert Tat eine Immunantwort des Körpers gegen andere virale Komponenten.

Auf eine mögliche Rolle von Tat in der Pathogenese der HIV-Infektion des zentralen Nervensystems wird in Kapitel 1.3.2. noch eingegangen.

### 1.1.2.2. Rev (regulator of expression of virion proteins)

#### *Aufbau und Domänenstruktur*

Retroviren stehen wie viele Viren vor dem Problem, aus einer einzelnen Transkriptionseinheit mit nur einem Promotor (der LTR) viele Genprodukte entstehen lassen zu müssen. Ein möglicher Regulationsmechanismus hierfür ist alternatives Spleißen. Damit ergibt sich wiederum das Problem, auch intronhaltige RNS ins Zytoplasma der Wirtszelle transportieren zu müssen, was in eukaryotischen Zellen per se nicht vorgesehen ist. Deshalb benötigen diese Viren einen Regulationsmechanismus, der die zytoplasmatische Expression auch ungespleißter oder partiell gespleißter RNS gewährleistet. Im Falle von HIV ist dieser Regulator das Rev-Protein.

HIV-1 Rev ist ein 116-As Phosphoprotein, das von zwei Exons kodiert und als frühes virales Protein exprimiert wird (Abb. 2). Die Funktion der Phosphorylierung ist noch unklar. Es wurde vermutet, daß die phosphorylierte Form eine stärkere RNS-Bindung vermittelt, aber es liegen keine *in vivo* Daten vor (Fouts, D. E. et al., 1997) (Kjems, J. und Askjaer, P., 1999).

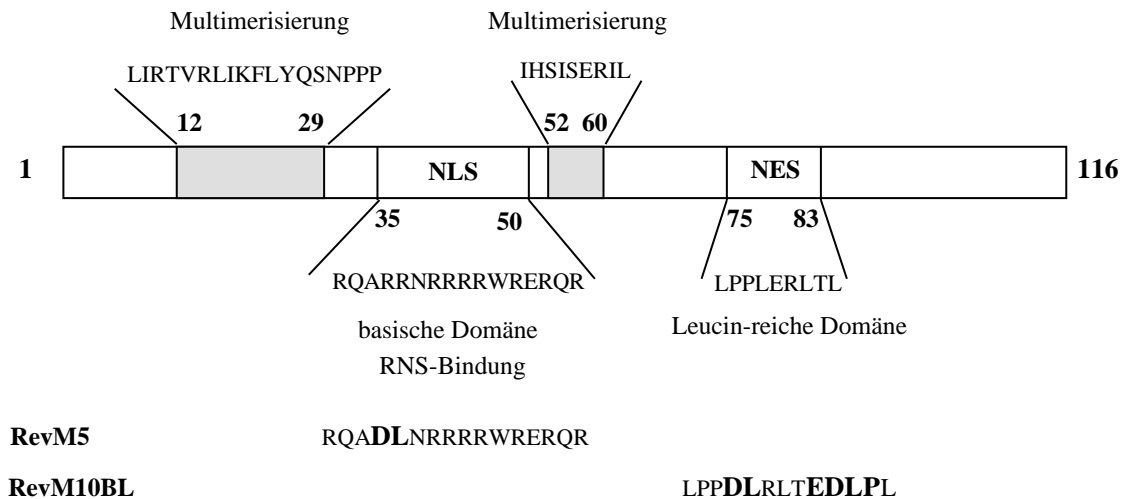
Das Rev-Protein kann im wesentlichen in zwei funktionelle Domänen aufgeteilt werden (Abb. 4). Die N-terminale Domäne reicht von As 12 bis 60 und umfaßt mit As 35 bis 50 die RNS-Bindedomäne und das nukleäre/nukleoläre Lokalisationssignal (NLS/NOS). Auf beiden Seiten der NLS liegt die zweigeteilte Oligomerisierungsdomäne. Die N-terminale Domäne (Aktivierungsdomäne) umfaßt die As 75 bis 83 und enthält das nukleäre Exportsignal (NES) (Szilvay, A. M. et al., 1995). Die As-Angaben sind Kjems und Askjaer sowie Pollard entnommen, jedoch insbesondere für die Oligomerisierungsdomäne in der Literatur nicht einheitlich (Kjems, J. und Askjaer, P., 1999) (Pollard, V. W. und Malim, M. H., 1998). Brice et al. beschrieben As 18 bis 26 und 54 bis 56 als essentiell für die Oligomerisierung (Brice, P. C. et al., 1999). Thomas et al. dagegen grenzten *in vivo* die Oligomerisierungsdomäne auf As 12 bis 32 und 52 bis 67 ein (Thomas, S. L. et al., 1997).

Abbildung 4 stellt die Rev-Mutanten M5 und M10BL vor, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. In RevM5 wurden gegenüber Rev zwei Arginine der RNS-Binderegion (Pos. 38 und 39) zu Asparaginsäure und Leucin ausgetauscht (Malim, M. H. et al., 1989). RevM5 ist nicht mehr funktionell und lokalisiert hauptsächlich zytoplasmatisch (Malim, M. H. et al., 1989). *In vitro* wie *in vivo* konnte keine Bindung an die Ziel-RNS festgestellt werden, RevM5 ist jedoch Oligomerisierungs-kompetent (Madore, S. J. et al., 1994) (Szilvay, A. M. et al., 1997).

RevM10BL enthält zwei Mutationen in der Aktivierungsdomäne. An As-Position 78/79 wurden Leucin und Glutaminsäure zu Asparaginsäure und Leucin ausgetauscht. Zwischen Position 82 und 83 wurde eine Insertion von vier As (EDLP) eingeführt (Stauber, R. et al., 1995). RevM10BL besitzt kein funktionsfähiges nukleäres Exportsignal mehr und akkumuliert im Nukleus. Die Mutante hat einen transdominant-negativen Phänotyp, d. h. die Funktion von wtRev wird durch die Anwesenheit von RevM10BL inhibiert (Stauber, R. et al., 1995).

Eine in vielen Studien beschriebene Mutante von Rev ist M10 (Madore, S. J. et al., 1994) (Thomas, S. L. et al., 1998). Ihr fehlt gegenüber RevM10BL die Insertion von vier Aminosäuren (= „BL“-Mutation), M10 und M10BL unterscheiden sich jedoch nicht in ihrer Funktion (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg, persönliche Mitteilung).





**Abb. 4:** Der strukturelle Aufbau des HIV-1 Rev-Proteins. Die Einteilung der funktionellen Domänen wurde im wesentlichen Kjems und Askjaer entnommen (Kjems, J. und Askjaer, P., 1999). Zusätzlich sind die Aminosäureaustausche eingezeichnet, die zu den in dieser Arbeit verwendeten Mutanten RevM5 und RevM10BL geführt haben. NLS – nukleäres Lokalisationssignal, NES – nukleäres Exportsignal.

#### Der Rev-Regulationszyklus

Der Regulationszyklus von Rev ist in Abb. 2 zusammengefaßt. Es wird zunächst eine Übersicht gegeben, um dann die für die vorliegende Arbeit wichtigsten Eigenschaften des Rev-Proteins detaillierter anzusprechen.

In der infizierten Zelle wird in der frühen Phase der HIV mRNA Expression durch die Tat-Transaktivierung und vollständiges Spleißen der entstehenden Transkripte zur 2kb-Transkriptklasse auch die Synthese von Rev vorangetrieben (Abb. 2). Ist eine bestimmte Menge an Rev in der Zelle vorhanden, wird der Übergang zur späten Phase der HIV mRNA Expression vermittelt (Abb. 2). Rev bindet im Zellkern an ungespleißte und einfach gespleißte RNS (entsprechend der Rev-abhängig exprimierten 9kb- und 4kb-Transkriptklasse), die seine Zielsequenz, die RRE (Rev responsive element) enthalten. Dadurch wird die RNS stabilisiert und die Halbwertszeit bis zu ihrem Abbau deutlich verlängert (Felber, B. K. et al., 1989) (Malim, M. H. und Cullen, B. R., 1993).

Rev oligomerisiert an der RNS und der Rev-RNS-Komplex wird ins Zytoplasma transportiert. Es werden zwei Mechanismen als wesentlich für die Rev-Funktion diskutiert: Die Inhibition des Spleißens und die Translokation der RNS ins Zytoplasma. Es konnte gezeigt werden, daß auch RNS ohne Introns effizient transloziert wird (Fischer, U. et al., 1994). Heterologe RNS, die normalerweise kernlokalisiert ist, wird, wenn sie die RRE enthält, durch Rev unabhängig von einem Spleißvorgang ins Zytoplasma transportiert (Fischer, U. et al., 1999). Demgegenüber wurde auch die Interaktion von Rev mit Spleiß-Faktoren und die Inhibition des Spleißens durch Rev mit Hilfe von *in vivo* wie *in vitro* Experimenten beschrieben (Boe, S. O. et al., 1998) (Powell, D. M. et al., 1997) (Kjems, J. et al., 1991). Die komplexe Regulation durch Rev ist sicherlich nicht auf eine „Hauptfunktion“ zu reduzieren, sondern ergibt sich aus der Summe vieler möglicher Funktionen.

Im Zytoplasma nimmt Rev Einfluß auf die Translation der RNS. Es wurde beschrieben, daß die Assoziation der RNS mit den Polysomen durch Rev erleichtert wird (Arrigo, S. J. und Chen, I. S., 1991) (D'Agostino, D. M. et al., 1992). Die RNS wird schließlich vom Protein freigesetzt und Rev gelangt wieder in den Kern. Rev ist ein „shuttle-Protein“, das ständig zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und hertransportiert wird (Richard, N. et al., 1994) (Meyer, B. E. und Malim, M. H., 1994). Im Zellkern kann Rev nun eine weitere RNS binden (Abb. 2). Auf den Im- und Export von Rev wird im Folgenden noch genauer eingegangen.

Die Gesamtheit der beschriebenen Funktionen und die dadurch erreichte Stimulation der Genexpression der viralen Strukturproteine wird als Transaktivierung durch Rev bezeichnet.

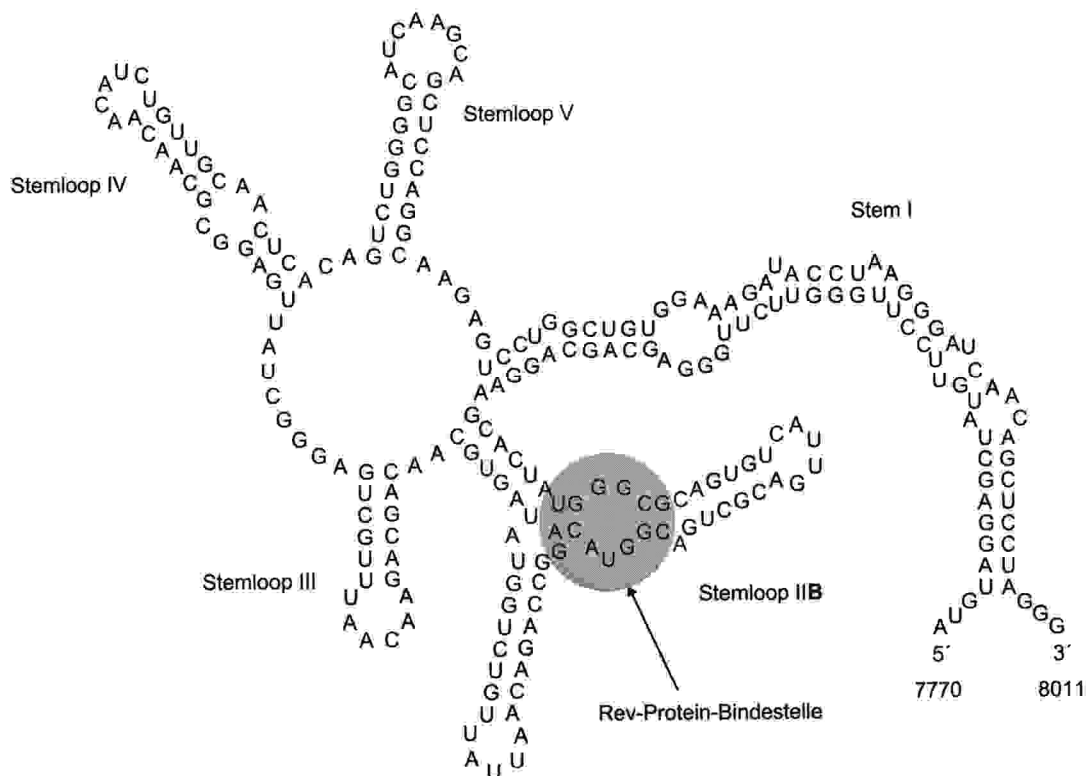
### *Die Bindung von Rev an die RNS und die Oligomerisierung*

Die Struktur der RRE ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Die primäre Bindungsstelle für Rev innerhalb der RRE ist der Bereich des SLIIB (stem loop IIB) (Heaphy, S. et al., 1990) (Tiley, L. S. et al., 1992). SLIIB kann von einem Rev-Monomer effizient gebunden werden (Zemmel, R. W. et al., 1996) (Van Ryk, D. I. und Venkatesan, S., 1999). Buonomo et al. konnten zeigen, daß auch kleine nukleoläre RNAs, an SLIIB gekoppelt, von Rev effizient in den Nukleoli gebunden und ins Zytoplasma transportiert werden können (Buonomo, S. B. et al., 1999). Da die RNS-Bindung und der Kernimport von Rev durch die gleiche Aminosäuresequenz vermittelt werden, ist es wahrscheinlich, daß durch die RNS-Bindung das Importsignal maskiert wird und das Exportsignal dominiert (Henderson, B. R. und Percipalle, P., 1997).

Das in der Literatur am häufigsten diskutierte Modell zur Bindung und Oligomerisierung von Rev ist das „Modell der kooperativen Rev-Bindung“. Die Bindung des ersten Rev-Moleküls destabilisiert demnach durch eine Konformationsänderung die Struktur der RRE (Tan, R. und Frankel, A. D., 1994) (Charpentier, B. et al., 1997). Dadurch wird es weiteren Rev-Molekülen ermöglicht, unter Einbeziehung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ebenfalls die RRE zu binden (Mann, D. A. et al., 1994) (Daly, T. J. et al., 1993). Charpentier et al. beschrieben, daß unter Verwendung einer Oligomerisierungs-defekten Mutante die initiale Bindung zwar stattfindet, jedoch die Konformationsänderung der RNS unterbleibt und die Oligomerisierung nicht stattfindet (Charpentier, B. et al., 1997). Oligomerisierungs-defekte Mutanten sind nicht mehr funktionell; die Oligomerisierung ist essentiell für die Transaktivierung (Madore, S. J. et al., 1994) (Cole, J. L. et al., 1993) (Mann, D. A. et al., 1994). Malim und Cullen konnten nachweisen, daß die Bindung eines Rev-Monomers nicht ausreichend für den Export der RNS aus dem Kern ist (Malim, M. H. und Cullen, B. R., 1991).

In diesem Zusammenhang wurde ein „Schwellenwert“ an Rev diskutiert, der zur effizienten HIV-Replikation überschritten werden muß. Er wurde auch als Regelmechanismus für die Latenz von HIV diskutiert (Pomerantz, R. J. et al., 1992). Demnach stellt die Oligomerisierung ein Maß für die Rev-Menge in der Zelle dar und reguliert so den Übergang zur späten Phase der HIV-Replikation (Mann, D. A. et al., 1994) (Kjems, J. und Askjaer, P., 1999). Die Menge der Rev-Moleküle im Oligomer wurde kürzlich mit Hilfe eines modifizierten „gel-shift“-Ansatzes auf mindestens 13 bestimmt (Brice, P. C. et al., 1999). Die Verknüpfung zwischen Bindung und Oligomerisierung wird jedoch noch kontrovers diskutiert. In der Literatur finden sich auch

Hinweise darauf, daß eine Oligomerisierung im Zytoplasma stattfindet und nicht ausschließlich im Zusammenhang mit der Bindung im Zellkern. Szilvay et al. beschrieben *in vivo* Untersuchungen, die auf dem Transport von Import-defekten Rev-Mutanten in den Zellkern aufgrund der Oligomerisierung mit einem Import-kompetenten Rev im Zytoplasma beruhen (Szilvay, A. M. et al., 1997). Auch Zapp et al. postulierten aufgrund von *in vitro* Experimenten die Oligomerisierung als Voraussetzung für eine Bindung (Zapp, M. L. et al., 1991). Jedoch wurden Rev-Mutanten charakterisiert, die entweder nur binden (RevM4) oder nur oligomerisieren (RevM5) (Madore, S. J. et al., 1994) (Malim, M. H. et al., 1989). Beide Mutanten sind interessanterweise hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert.



**Abb. 5:** Die Struktur der Rev-Zielsequenz RRE. Der stem loop IIB (Nukleotide 45 bis 75) ist ausreichend für die initiale Bindung durch Rev. Die Bindestelle ist hervorgehoben. Die Abbildung wurde Modrow und Falke entnommen (Modrow, S. und Falke, D., 1997).

### Der Im- und Export von Rev

Das Rev-Protein ist ein „shuttle-Protein“, das ständig zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und hertransportiert wird. Die Domänenstruktur von Rev und die Lage des Import- und Exportsignals (NLS/NES) wurden in Abbildung 4 beschrieben. Der aktive Transport von Rev über die Kernmembran ist von einer Reihe zellulärer Faktoren abhängig. Abbildung 6 gibt einen Überblick über den Transport und die im wesentlichen daran beteiligten Faktoren.

Im Zellkern befindet sich der Rev-RNS-Komplex. Die Leucin-reiche Exportdomäne von Rev wird von dem Exportfaktor CRM1 (= Exportin 1) gebunden (Fornerod, M. et al., 1997) (Neville, M. et al., 1997). CRM1 interagiert seinerseits mit Komponenten der Kernporen (NPCs), die den Transport vermitteln, sowie der GTPase Ran. Ran hat mindestens zwei Aufgaben: Zum einen

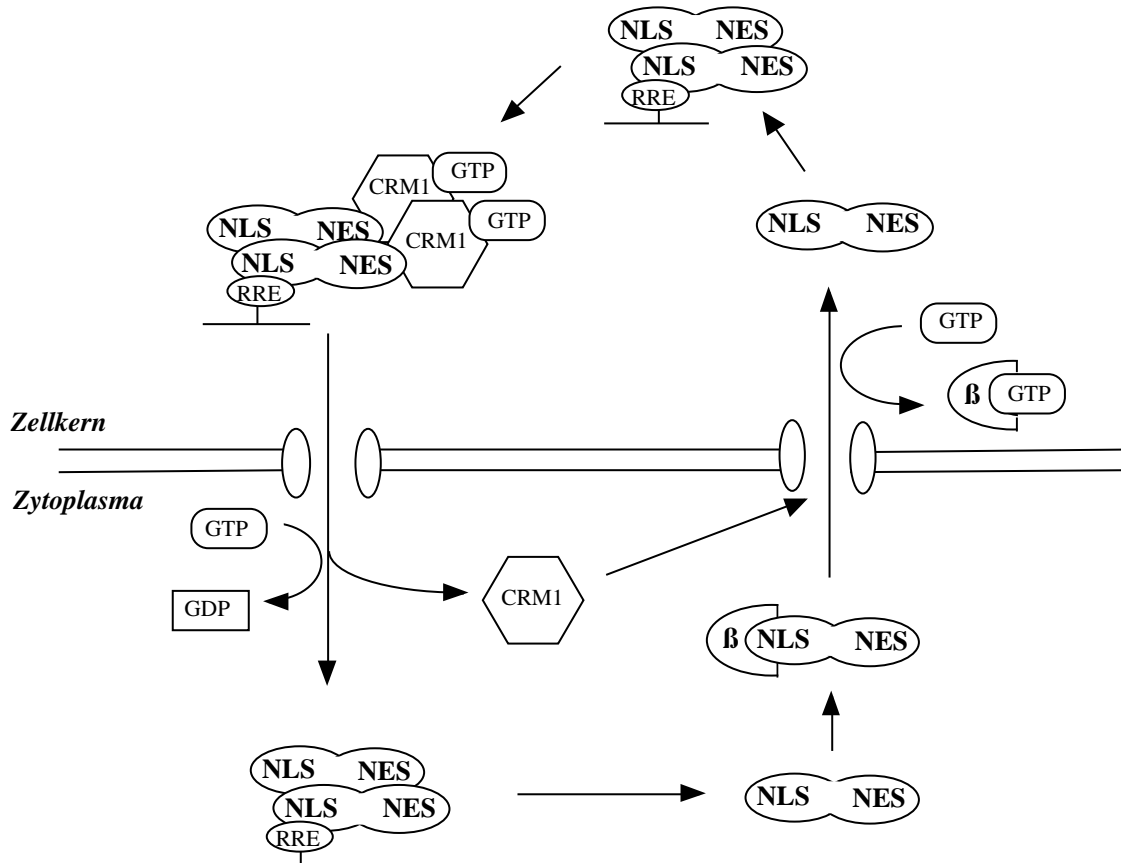
stellt sie durch die Hydrolyse von GTP zu GDP die Energie für den aktiven Transport zur Verfügung. Zum anderen dient sie als Regelmechanismus für den Transport. Im Kern findet sich eine hohe GTP-Konzentration, im Zytoplasma eine hohe GDP-Konzentration (Izaurrealde, E. et al., 1997). Eine Reihe von Ran-interagierenden Faktoren wurden beschrieben, die auf jeder Seite der Kernmembran dazu beitragen, diesen Gradienten aufrechtzuerhalten (z. B. „Ran binding protein“ 1 und 2 (Kehlenbach, R. H. et al., 1999) und der „nucleotide exchange factor“ RCC1 (Bischoff, F. R. und Ponstingl, H., 1991) (Mattaj, I. W. und Englmeier, L., 1998)). Der Gradient ist richtungsweisend für den aktiven Transport.

Als Rezeptor für den energieunabhängigen Re-Import von RanGDP in den Kern konnte NTF2 identifiziert werden (Ribbeck, K. et al., 1998).

Der CRM1-abhängige Exportweg kann spezifisch durch Leptomycin B (LMB), einen Streptomyces-Metaboliten, inhibiert werden. Mit Hilfe von LMB gelang es, die Abhängigkeit des Rev-Transportes von CRM1 nachzuweisen (Fornerod, M. et al., 1997). In LMB-behandelten Zellen verbleibt Rev im Kern, und auch der Transport RRE-haltiger RNS ist somit inhibiert. Die HIV-Replikation in primären humanen Monozyten konnte so erfolgreich unterdrückt werden (Wolff, B. et al., 1997). Obwohl LMB in der Therapie aufgrund seiner Toxizität nicht verwendet werden kann, stellt es ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Transportvorgängen in der Zelle dar. LMB bindet kovalent an ein einzelnes Cystein in CRM1 und blockiert dadurch den Transport (Kudo, N. et al., 1999).

Im Zytoplasma dissoziiert der Rev-CRM1-Komplex unter Hydrolyse von GTP zu GDP durch Ran (Pollard, V. W. und Malim, M. H., 1998). CRM1 gelangt zurück in den Kern. Durch die Freisetzung der RNS wird das Importsignal von Rev wieder frei zugänglich. Die Arginin-reiche NLS von Rev wird direkt durch Importin  $\beta$  gebunden (Henderson, B. R. und Percipalle, P., 1997) (Palmeri, D. und Malim, M. H., 1999). Demgegenüber wird für viele zelluläre Proteine die Bindung an Importin  $\beta$  beschrieben, das als Adaptor zwischen Importin  $\beta$  und dem NLS-Protein dient (Kutay, U. et al., 1997). Importin  $\beta$  bindet an Nukleoporene der Kernpore. Die Assoziation von Importin  $\beta$  mit RanGTP im Kern führt zur Freisetzung des transportierten Proteins (Izaurrealde, E. et al., 1997).

Es wurde vermutet, daß Importin  $\beta$  mit der RRE um die Rev-Bindung kompetiert. Truant et al. zeigten, daß Importin  $\beta$  *in vitro* die Rev-RRE-Interaktion inhibiert, wohingegen die Bindung durch Zugabe von RanGTP wiederhergestellt wurde (Truant, R. und Cullen, B. R., 1999). Diese Interaktion könnte bei der Freisetzung der RNS von Rev im Zytoplasma eine Rolle spielen.



**Abb. 6:** Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Rev-Transportweges und der wichtigsten zellulären Interaktionspartner. NLS und NES kennzeichnen das Rev-Protein. GTP – RanGTP, GDP – RanGDP,  $\beta$  - Importin  $\beta$ . Details sind im Text beschrieben. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Pollard und Malim erstellt (Pollard, V. W. und Malim, M. H., 1998).

### 1.1.2.3. Die akzessorischen Proteine

HIV besitzt vier akzessorische Proteine, die für die Virusreplikation nicht essentiell sind und nur bei HIV vorkommen.

#### *Nef (negative factor)*

Neben Tat und Rev ist Nef das dritte frühe Genprodukt von HIV und seine Expression damit Rev-unabhängig (Abb. 2). Nef wird stark exprimiert und ist oft als erstes HIV-Protein in infizierten Zellen nachzuweisen (Cullen, B. R., 1998). Das Protein zeigt eine Reihe von Aktivitäten, die zu einer Erhöhung der Replikationsrate und Pathogenität von HIV führen (zusammengefaßt in (Marsh, J. W., 1999)). Nef besteht aus 206 Aminosäuren, ist N-terminal myristyliert und findet sich in der Plasmamembran und dem Golgi Apparat.

Eine der zuerst beschriebenen Fähigkeiten von Nef ist die Herabregulation von CD4 an der Oberfläche der infizierten Zelle (Guy, B. et al., 1987). Nef interagiert in der Plasmamembran mit CD4 einerseits und sog. Adaptermolekülen (AP-1 und AP-2) andererseits (Piguet, V. et al., 1998) (Le Gall, S. et al., 1998). Ein endozytotischer Prozess leitet daraufhin CD4 über Clathrin-beschichtete Bläschen in Lysosomen, wo es abgebaut wird (Aiken, C. et al., 1994) (Piguet, V.

und Trono, D., 1999). Dadurch wird eine Superinfektion der Wirtszelle verhindert und die Freisetzung der neuen Virionen erleichtert. Darüber hinaus könnte neusynthetisiertes Env an der Zelloberfläche CD4 binden und ein korrektes Zusammenbauen der neuen Viruspartikel inhibieren (Hahn, B., 1994).

Die Expression von MHC Klasse I Molekülen (major histocompatibility complex) an der Zelloberfläche wird von Nef über einen ähnlichen Mechanismus herabreguliert wie CD4, allerdings mit geringerer Effizienz (Le Gall, S. et al., 1998). MHCI-Moleküle sind Rezeptoren für spezifische Antigene, z. B. virale, die so an der Zelloberfläche präsentiert werden. Dadurch werden zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) aktiviert. Die Herabregulation vermindert die CTL-vermittelte Lyse HIV-infizierter Zellen (Collins, K. L. et al., 1998)

Nef scheint auch eine Funktion in der Modulation der Signaltransduktionswege der Zelle zu besitzen. Interaktionen von Nef mit mindestens zehn verschiedenen Kinasen wurden nachgewiesen (zusammengefaßt in (Marsh, J. W., 1999)). Nef-Mutanten, die nicht mehr die Fähigkeit zur Herabregulation von CD4 besitzen, binden weiterhin diese Kinasen, was eine indirekte Einflußnahme auf die Signaltransduktion aufgrund des Fehlens von CD4 ausschließt. Dennoch blieb der genaue Mechanismus bisher unklar (Saksela, K. et al., 1995).

Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, daß Nef in infizierten Makrophagen die Produktion von Chemokinen induziert. Die Chemokine locken ruhende T-Zellen an und steigern die Wahrscheinlichkeit ihrer Infektion. Nef treibt so die Verbreitung des Virus im Wirt voran (Swingler, S. et al., 1999).

#### *Vif (virion infectivity factor)*

Vif ist ein 192 As Protein, das in der späten Phase des Replikationszyklus von HIV Rev-abhängig exprimiert wird. Es lokalisiert zytoplasmatisch, aber auch membranassoziiert und in Kolokalisation mit Gag (Cullen, B. R., 1998). Kürzlich wurde in Vif ein Peptidsignal identifiziert, das den Kernimport inhibiert (Friedler, A. et al., 1999).

Die genaue Funktion von Vif ist noch unklar. Vif erhöht die Infektiosität von Virionen in nicht-permissiven Zelltypen wie H9 T-Zellen (Gabuzda, D. H. et al., 1992) (Sakai, H. et al., 1993). Infektiositäts-Mutanten beobachtet man ausschließlich in nicht-permissiven Zellen, permissive Zellen wie CEM-Zellen dagegen scheinen ein Fehlen von Vif kompensieren zu können (Cohen, E. A. et al., 1996). In diesem Zusammenhang wurde ein Einfluß von Vif auf die Stabilität der Prä-Integrationskomplexe (PICs) beschrieben (Simon, J. H. und Malim, M. H., 1996).

#### *Vpu (viral protein u)*

Vpu ist ein integrales Membranphosphoprotein von 81 As Länge, das nur bei HIV-1 und dem nahe verwandten SIV<sub>cpz</sub> vorkommt. Seine Expression ist ebenfalls Rev-abhängig (Trono, D., 1995). Vpu bindet in seiner phosphorylierten Form im endoplasmatischen Retikulum an neu synthetisiertes CD4 und führt es der Proteolyse in Proteasomen zu (Margottin, F. et al., 1998) (Schubert, U. et al., 1998). Auch Env bindet im ER an CD4, kann jedoch nach dessen Abbau an die Oberfläche transportiert werden (Emerman, M. und Malim, M. H., 1998). Die Proteolyse

von neu synthetisiertem CD4 wirkt so zusammen mit der schon beschriebenen Funktion von Nef, CD4 an der Oberfläche abzubauen, einer Superinfektion der Zelle entgegen. Wie Nef kann auch Vpu die Expression von MHC Klasse I herabregulieren (Kerkau, T. et al., 1997).

Vpu erhöht die Menge an von der Zelloberfläche freigesetztem Virus (Klimkait, T. et al., 1990). Dieser von der N-terminalen Domäne vermittelte Effekt scheint jedoch unspezifisch zu sein, da auch die Freisetzung heterologer retroviraler Partikel gefördert wird (Lamb, R. A. und Pinto, L. H., 1997) (Cohen, E. A. et al., 1996). Vpu-negative Viruspartikel akkumulieren an der Zelloberfläche oder an intrazellulären Membranen (Frankel, A. D. und Young, J. A., 1998).

### *Vpr (viral protein r)*

Vpr ist ein 96 As Protein, das in der späten Phase der HIV-Replikation Rev-abhängig exprimiert wird. Es ist nach der Infektion am Transport der Prä-Integrationskomplexe (PICs) in den Zellkern beteiligt und erforderlich für die Replikation von HIV in Zellen, die sich nicht teilen (Bukrinsky, M. und Adzubei, A., 1999). Vpr besitzt ein unkonventionelles nukleäres Lokalisationssignal und verstärkt vermutlich die Wechselwirkung von im PIC enthaltenen nukleären Lokalisationssignalen mit Importin (Popov, S. et al., 1998). Ferner kann schon das virionassoziierte Vpr einen G2-Zellzyklusarrest auslösen und die LTR-abhängige Genexpression erhöhen (Goh, W. C. et al., 1998) (Hrimech, M. et al., 1999). Dadurch wird eine Apoptose der Zellen beschleunigt (Cullen, B. R., 1998) (Re, F. et al., 1995).

## **1.2. Der Replikationszyklus von HIV**

HIV infiziert hauptsächlich T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten sowie Mikroglia-Zellen des Gehirns. Diese Zelltypen tragen auf ihrer Zelloberfläche das CD4-Molekül. CD4 ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie und der Rezeptor für HIV. Es wird von gp120 in der Hülle der Viren gebunden. Allerdings ist die Bindung nicht ausreichend für die Infektion; nach einer Konformationsänderung im gp120 erfolgt eine Interaktion mit einem Korezeptor. 1996 wurden die Chemokinrezeptoren CCR5 als Korezeptor für Makrophagentrope Viren (Alkhatib, G. et al., 1996) (Choe, H. et al., 1996) bzw. CXCR4 als Korezeptor für T-Zelltrope Viren identifiziert ((Feng, Y. et al., 1996), zusammengefaßt in (Littman, D. R., 1998)). Nach der Bindung vermittelt das Transmembranprotein gp41 die Fusion der Zellmembran mit der Virushülle, wobei die Fusion durch die oben beschriebene Konformationsänderung im gp120 erleichtert wird (Chan, D. C. und Kim, P. S., 1998). Das Kapsid wird in die Zelle freigesetzt, wo die reverse Transkriptase und die virale RNaseH an der RNS als Matrize eine doppelsträngige DNS synthetisieren. Der Nukleoprotein-Komplex, der die DNS enthält, wird unter Beteiligung der nukleären Lokalisationssignale im Matrixprotein und in Vpr in den Zellkern transportiert (zusammengefaßt in (Nakielny, S. und Dreyfuss, G., 1997)). Im Zellkern wird die entstandene doppelsträngige DNS durch die virale Integrase in das Wirtszellgenom integriert. Der Promotor für die viralen Gene, die nun wie ein zelleigenes Gen im Genom vorliegen und auch von der Zelle repliziert werden, ist der 5'-LTR. Durch die Wirkung der viralen Regulatoren Tat und Rev

(vgl. Kap. 1.1.2.2.1. und 1.1.2.2.2., Abb. 2) und in einem komplexen Zusammenspiel mit der zellulären Transkriptions- und Translationsmaschinerie werden die viralen Gene exprimiert.

Für die Entstehung neuer Virionen werden die Gag- und Gag Pol-Polyproteine zur Membran der Zelle geleitet. Das NC-Protein bindet das Verpackungssignal in der vollständigen RNS und bringt diese als neues Genom zum entstehenden Virion. Die ausknospenden Viren reifen erst nach ihrer Freisetzung aufgrund der Prozessierung der Protein-Vorläufer von der im Partikel mitgeführten Protease zu infektiösen Viren (Garnier, L. et al., 1998) (Freed, E. O., 1998).

### *Die Latenz von HIV und zelluläre Virus-Reservoirs*

Eine Ausnahme des oben dargestellten Replikationszyklus stellt die latente HIV-Infektion dar. In diesem Fall werden die Zielzellen infiziert und das Provirus in das Wirtszellgenom integriert, die virale Genexpression ist jedoch minimal und nicht ausreichend zur Produktion neuer Virionen (Stevenson, M., 1997). Die Zellen sind jedoch prinzipiell in der Lage, Virionen zu produzieren, wenn die äußeren Bedingungen es zulassen. Ein häufig zitiertes Beispiel für virale Latenz sind Herpesviren, deren Produktion durch Einflußfaktoren wie etwa Streß, Fieber oder eine außergewöhnliche hormonelle Situation reaktiviert werden kann (Modrow, S. und Falke, D., 1997).

Es wurden eine Reihe von Zellkultur-Modellen für die HIV-Latenz etabliert (McCune, J. M., 1995). Die molekulare Basis der Latenz ist jedoch nicht vollständig geklärt. Es konnte nachgewiesen werden, daß in latent infizierten Zellen das mRNS-Muster zugunsten der 2kb-Transkriptklasse verschoben ist (Seshamma, T. et al., 1992). Das Transkriptmuster entspricht damit dem eines Rev-defekten Virus, weshalb die Rev-Regulation mit der Latenz von HIV in Verbindung gebracht wurde (Pomerantz, R. J. et al., 1992). Auch ein Defekt von Tat im zellulären Kontext wurde diskutiert, der in der chronisch infizierten Monozyten-Zelllinie U1 durch eine Tat-Überexpression aufgehoben werden konnte (Duan, L. et al., 1994). Duan et al. beschrieben weiter, daß in der T-Zelllinie ACH-2 die Latenz nicht durch Tat aufzuheben war, sondern vielmehr auf die Integrationsstelle des Provirus im Wirtszellgenom zurückzuführen war. Latent HIV-infizierte Zellen können nach ihrer Aktivierung durch Cytokine wie TNF und Interleukin-6 (Il-6) oder durch Phorbol-Ester produktiv Virus freisetzen (Bednarik, D. P. und Folks, T. M., 1992) (Fauci, A. S., 1993).

Stevenson unterschied darüber hinaus die latente Infektion von der „eingeschränkten Infektion“, die durch einen Defekt im Provirus oder in strukturellen bzw. enzymatischen Komponenten des Virus ausgelöst wird (Stevenson, M., 1997). Dagegen bezeichnete McCune diesen Fall als einen Sonderfall der latenten Infektion (McCune, J. M., 1995). Die Virusproduktion ist nicht mehr aktivierbar.

Latent infizierte Zellen können Virus-Reservoirs bilden. Das größte Reservoir für HIV sind nach Chun und Fauci ruhende CD4-positive T-Zellen (Chun, T. W. und Fauci, A. S., 1999). Darüber hinaus existieren Virus-Reservoirs im zentralen Nervensystem (ZNS), Lymphgewebe, Knochenmark und weiteren Organen (Schrager, L. K. und D'Souza, M. P., 1998). Die Reservoirs werden als einer der hauptsächlichen Gründe dafür angesehen, daß es nicht möglich ist, das Virus aus dem Körper zu eliminieren (Chun, T. W. und Fauci, A. S., 1999). Auch nach



mehrfähriger Therapie von Patienten mit HAART (highly active antiretroviral therapy), während derer keine meßbare Virusmenge festzustellen war, war bereits wenige Tage nach Absetzen der Therapie wieder ein starker Anstieg an viraler RNS im Plasma zu verzeichnen (Harrigan, P. R. et al., 1999). Allerdings zeigten Chun et al. kürzlich, daß in 7 von 9 Patienten Virussequenzen aus ruhenden CD4-positiven Zellen nicht mit denen identisch sind, die im peripheren Blut nach Absetzen einer Therapie wieder auftreten (Chun, T. W. et al., 2000). Die Autoren postulierten weitere, bisher womöglich noch nicht charakterisierte Virusreservoirs.

Auf die Bedeutung des ZNS als HIV-Reservoir wird im folgenden Kapitel 1.3. eingegangen.

### **1.3. Die HIV-Infektion des zentralen Nervensystems**

#### **1.3.1. Symptomatik und Infektionsweg**

HIV infiziert nicht nur Zellen des Immunsystems, sondern auch Zellen des ZNS. Schon zwei Wochen nach der Infektion konnte provirale DNS in Gehirngewebe mit Hilfe der PCR nachgewiesen werden (Davis, L. E. et al., 1992). Die Symptome der HIV-Infektion des ZNS sind langsam fortschreitende neurologische Beeinträchtigungen wie motorische Störungen und Konzentrationsschwäche und reichen bis hin zum Krankheitsbild der schweren Demenz. Man beobachtet die Symptome bei etwa 25-30% der AIDS-Patienten (Vitkovic, L. und Tardieu, M., 1998) und spricht von HIV-Demenz (HIVD) oder AIDS-Demenz-Komplex (ADC). Pathologische Veränderungen im Gehirn wie die Formation von multinukleären Riesenzellen oder der Verlust von Neuronen wurden bei etwa 50% der Gehirn-Autopsien von AIDS-Patienten festgestellt (Vitkovic, L. und Tardieu, M., 1998). In über 80% der untersuchten Fälle von Verstorbenen mit AIDS wurde provirale DNS im Gehirn gefunden (Brack-Werner, R., 1999). Allerdings scheint die neurologische Symptomatik nicht notwendigerweise mit einer hohen Viruslast im Gehirn in Zusammenhang zu stehen. Darüber hinaus läßt die Virusproduktion nicht auf die Menge an Provirus und damit auf das Ausmaß an infizierten Zellen schließen (McArthur, J. C. et al., 1997). Unabhängig vom Auftreten neurologischer Störungen kann die Viruslast in Gehirn und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) die Viruslast in peripheren mononukleären Blutzellen in Einzelfällen übertreffen (Schmid, P. et al., 1994) (Ellis, R. J. et al., 1997).

Diese Daten verdeutlichen, daß die Mechanismen der HIV-Infektion im Gehirn sich von denen des Immunsystems prinzipiell unterscheiden. Man geht davon aus, daß die Auswirkungen der Infektion im Gehirn eher „indirekter“ Natur sind (z. B. durch die Fehlregulation der Chemokin-Expression, vgl. Kap. 1.3.2.) als durch die HIV-Replikation und Viruslast direkt bedingt (Miller, R. J. und Meucci, O., 1999). Darüber hinaus scheint das ZNS ein eigenes Kompartiment bezüglich der HIV-Entwicklung darzustellen; so wurden aus der Cerebrospinalflüssigkeit Viren isoliert, die sich von Isolaten aus dem peripheren Blut derselben Individuen unterschieden (Cheng-Mayer, C. et al., 1989).

Zum Viruseintritt in das Gehirn bestehen verschiedene Theorien. Die Blut-Hirn-Schranke grenzt den Blutkreislauf gegen die Gehirnflüssigkeit ab und schafft so eine eigene Umgebung für das Gehirn. Sie wird unter anderem von Endothelzellen gebildet, die von zellfreiem Virus

infiziert werden können. Von dort kann das Virus an Astrozyten weitergegeben werden, die ein weiterer wichtiger Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke und über ihre Fortsätze mit den Endothelzellen verbunden sind. Sie haben unter anderem eine Funktion bei der Kontrolle des Eintritts von Metaboliten in das Gehirn (zur Funktion von Astrozyten vgl. Kap. 1.3.3.).

Eine weitere Möglichkeit der Infektion des ZNS ergibt sich aus dem Transport von infizierten Monozyten oder T-Zellen, die die Blut-Hirn-Schranke infiltrieren ((Persidsky, Y. et al., 1997), zusammengefaßt in (Fujimura, R. K. et al., 1996) (Kolson, D. L. et al., 1998)). Kürzlich wurde an einem Labor-Modell der Blut-Hirn-Schranke und am Maus-Modell gezeigt, daß die von Mikroglia-Zellen und Astrozyten produzierten Chemokine einen wesentlichen Einfluß auf die Einwanderung von Monozyten ins Gehirn haben (Persidsky, Y. et al., 1999).

Zielzellen von HIV im Gehirn sind Makrophagen, Mikrogliazellen, Endothelzellen, Astrozyten und möglicherweise Oligodendrozyten und Neuronen (Bagasra, O. et al., 1996). Dabei werden hauptsächlich Makrophagen und Mikrogliazellen produktiv infiziert (Wiley, C. A. et al., 1999). Sie wurden deshalb lange für die einzigen Zellen des ZNS gehalten, die von HIV infiziert werden. Allerdings findet man in Astrozyten frühe Genprodukte, jedoch meist keine Expression von viralen Strukturproteinen, was eine nicht-produktive Infektion dieser Zellen vermuten ließ (Brack-Werner, R., 1999). Die Infektion von Astrozyten wird in Kapitel 1.3.4. genauer diskutiert.

### **1.3.2. *Effekte von Tat auf die Pathogenese der HIV-Infektion im ZNS***

In Kapitel 1.3.1. wurde beschrieben, daß das Fortschreiten HIV-bedingter neurologischer Defekte nicht notwendigerweise zur Viruslast im ZNS in Bezug gesetzt werden kann. In der Literatur finden sich häufig Studien zur vermehrten Expression von Cytokinen und Adhäsionsmolekülen sowie zur verstärkten Einwanderung von Leukozyten in das ZNS. Besonders eine mögliche Beteiligung von Tat an der Pathogenese des ZNS wird betont.

In Kapitel 1.1.2.2.1. wurde dargelegt, daß Tat von infizierten Zellen sezerniert und von nicht-infizierten Zellen aufgenommen werden kann. Dort kann Tat in den Zellkern gelangen und stimulatorische Effekte auslösen. Ma und Nath beschrieben die Aufnahme von Tat durch humane fötale Astrozyten und Neuronen, die wesentlich vom C-Terminus des Proteins (As 72 bis 86) abhängig war (Ma, M. und Nath, A., 1997).

Tat kann die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke verändern und so die Aufnahme von infizierten Zellen ins ZNS erleichtern (Hofman, F. M. et al., 1994). Tat induziert die Expression von Chemokinen wie MCP-1 (Monocyte chemoattractant Protein-1) und Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1) in Astrozyten, die wiederum die Einwanderung von Monozyten über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn fördern (Weiss, J. M. et al., 1999) (Conant, K. et al., 1998) (Woodman, S. E. et al., 1999). Die vermehrte Anwesenheit aktivierter Immunzellen (Monozyten/Makrophagen) konnte mit der Schwere der neurologischen Symptome korreliert werden (Glass, J. D. et al., 1995). Durch die Fehlregulation von Chemokinen und Cytokinen durch Tat werden die Funktionen von Astrozyten moduliert, was zur vermehrten Apoptose von Neuronen führen kann. TGF- z. B. führt zu einer Inhibition der Glutamin-Synthetase der

Astrozyten, die dann das für Neuronen toxische Glutamat nicht mehr umsetzen können (Rappaport, J. et al., 1999). Es wurde gezeigt, daß lösliches Tat von nicht-infizierten Zellen aufgenommen wird und insbesondere in Astrozyten die Expression von TGF- und TNF-heraufreguliert (Sawaya, B. E. et al., 1998).

Zusammenfassend ist die Expression und Sezernierung von Tat durch Zellen des ZNS aufgrund multipler Effekte offensichtlich kritisch für das Fortschreiten der Symptome der Demenz (Rappaport, J. et al., 1999). Die frühe Expression von Tat im Infektionszyklus sollte daher auch bei der Entwicklung von antiretroviralen Therapien nicht unberücksichtigt bleiben. Insbesondere die Hemmung der HIV-Replikation durch eine Inhibition von Rev läßt weiterhin eine uneingeschränkte Expression von Tat zu.

### **1.3.3. Die HIV-Infektion von humanen Astrozyten**

Die Zellen des Gehirns werden im wesentlichen in Neuronen und Gliazellen unterteilt. Innerhalb der Gliazellen können Mikro- und Makrogliazellen unterschieden werden. Astrozyten gehören neben den Oligodendrozyten zu den Makrogliazellen und stellen mit bis zu 40% den größten Anteil der Zellpopulation des ZNS dar. Sie sind an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt und bilden ein Netzwerk, das z. B. zur Regulation von Ionenkonzentrationen und dem Umsatz von Neurotransmittern beiträgt. Astrozyten besitzen Rezeptoren zur Aufnahme von Glutamat, wandeln es in Glutamin um und stellen dieses den Neuronen wieder zur Verfügung. Sie unterstützen das Wachstum von Neuronen und ummanteln Blutgefäße im Gehirn. Nach ihrer Aktivierung z. B. durch Verletzung exprimieren Astrozyten verstärkt Cytokine und Wachstumsfaktoren (zusammengefaßt in (Brack-Werner, R., 1999)).

Der Mechanismus der HIV-Infektion von Astrozyten wird kontrovers diskutiert, verläuft aber in jedem Fall CD4-unabhängig. CXCR4 konnte für humane Astrozyten nicht nachgewiesen werden (Sanders, V. J. et al., 1998). CCR5 wurde für Astrozyten gesunder Individuen gefunden (Rottman, J. B. et al., 1997), in einer unabhängigen Studie jedoch nur bei AIDS-Patienten mit neurologischen Störungen, nicht aber in der uninfizierten Kontrollgruppe (Sanders, V. J. et al., 1998). Kürzlich wurde beschrieben, daß humane fötale Astrozyten unabhängig von CD4 und den Korezeptoren CXCR4, CCR5, CCR3 und CCR2b von verschiedenen HIV-1 Isolaten infiziert werden (Sabri, F. et al., 1999). Die Expression von mRNS für CXCR4 und CCR5 wurde jedoch nachgewiesen. Dagegen beschrieben Klein et al. die Expression von CXCR4 und CCR5 an der Oberfläche humaner fötaler Astrozyten (Klein, R. S. et al., 1999). Auch die Beteiligung einer Rezeptor-vermittelten endozytotischen Aufnahme des Virus im Gegensatz zur Membranfusion wird diskutiert (Hao, H. N. und Lyman, W. D., 1999).

### **1.3.4. Die Replikation von HIV in humanen Astrozyten**

Die Infektion von Astrozyten im Gehirn konnte an Gewebeproben hauptsächlich durch die Expression früher Gene wie Nef oder den Nachweis proviraler DNS gezeigt werden. Dagegen blieben Untersuchungen zum Nachweis viraler Strukturproteine weitestgehend negativ (Nuovo,

G. J. et al., 1994) (Ranki, A. et al., 1995) (Brack-Werner, R., 1999). Daher wurde eine nicht-produktive Infektion von Astrozyten postuliert. Diese Annahme konnte inzwischen durch zahlreiche Experimente mit Zelllinien und primären Astrozyten bestätigt werden.

Ein Modellsystem für die verminderte HIV-Replikation in Astrozyten ist die chronisch infizierte Zelllinie TH4-7-5, die umfassend charakterisiert wurde (Brack-Werner, R. et al., 1992) (Herrmann, R., 1992) (Neumann, M., 1993). Es konnte gezeigt werden, daß die viralen Strukturproteine Gag und Env nur sehr schwach exprimiert werden, wohingegen Nef als frühes Genprodukt stark exprimiert wird. Die Sequenzierung des integrierten Provirus ergab keine Unterschiede zur Wildtypsequenz. Kokultiviert man TH4-7-5 mit CD4-positiven Blutzellen, so werden letztere produktiv infiziert.

Da die Expression der viralen Strukturproteine durch das Rev-Protein reguliert wird (vgl. Kap. 1.1.2.2.2.), lag die Vermutung nahe, daß die Funktion dieses Proteins in Astrozyten beeinträchtigt ist. Neumann et al. konnten zeigen, daß in der Zelllinie TH4-7-5 weniger mRNS für die Rev-abhängig regulierte Expression der viralen Strukturproteine akkumuliert, wohingegen die Menge an gespleißten Transkripten nicht verringert ist (Neumann, M. et al., 1995). Das Expressionsmuster entspricht damit dem eines Rev-defekten Virus. Studien an verschiedenen Astrozytomzelllinien sowie humanen fötalen Astrozyten konnten zeigen, daß die Rev-abhängige Expression der viralen Strukturproteine in Astrozyten im Vergleich zu permissiven Kontrollzellen um etwa einen Faktor 10 vermindert ist (Ludwig, E. et al., 1999). Ein Defekt in der Funktion des Rev-Proteins wurde in Kapitel 1.2. bereits als mögliche Ursache der HIV-Latenz diskutiert. Allerdings zeigten Kleinschmidt et al., daß die Virusproduktion in Astrozyten nicht durch TNF oder Phorbol ester aktivierbar ist (Kleinschmidt, A. et al., 1994). Dies deutete darauf hin, daß die Infektion von Astrozyten nicht einen Latenzmechanismus darstellt, sondern einen zellspezifischen inhibitorischen Mechanismus (nach der Definition von Stevenson, die in Kapitel 1.2. angeführt wurde, eine „eingeschränkte Infektion“ (Stevenson, M., 1997)).

Die verminderte Funktion von Rev geht mit einer ungewöhnlichen Akkumulation des Proteins im Zytoplasma der Astrozyten einher. Neue Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, daß die Aufnahme von Rev in den Kern der Astrozyten vermindert ist. Fusioniert man Rev-exprimierende Kontrollzellen mit Astrozyten, so ist auch der Transport dieses - in den Kontrollzellen funktionellen - Rev-Proteins in den Astrozytenkern vermindert (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg, persönliche Mitteilung). Auch diese Ergebnisse sprechen für einen Astrozyten-spezifischen inhibitorischen Mechanismus.

Im Gegensatz zu diesen Studien, die eine Beeinträchtigung der Rev-abhängigen Regulation zeigten, postulierten Gorry et al. eine verminderte Translation des Gag-Proteins in der Astrozytomzelllinie U251 (Gorry, P. R. et al., 1999). Die Untersuchungen ergaben, daß in diesem Beispiel die mRNS-Mengen für die Strukturproteine und ihre Transportrate aus dem Zellkern ins Zytoplasma nicht vermindert sind.

Auch die Aktivität der HIV-LTR kann in Astrozyten verändert sein. Ludvigsen et al. konnten in der chronisch infizierten Astrozytomzelllinie TH4-7-5 eine inhibitorische Auswirkung eines Teiles der Nef-Sequenz auf die LTR-Aktivität feststellen (Ludvigsen, A. et al., 1996). Die TAR-

unabhängige Aktivierung der LTR durch Tat wurde in Kapitel 1.1.2.2.1. der vorliegenden Arbeit schon angesprochen.

Astrozyten sind der erste bekannte humane Zelltyp, der eine nicht-produktive HIV-Infektion und eine verminderte Rev-Funktion aufweist. Da Astrozyten den Großteil der Zellpopulation im ZNS ausmachen, stellen sie ein wichtiges Reservoir für das Virus dar (Brack-Werner, R., 1999). Die Infektion von Makrophagen und Mikroglia durch Astrozyten könnte das Virus möglicherweise immer wieder im Patienten ausbreiten und so den Erfolg einer Therapie beeinflussen. In Kapitel 1.3.1. wurde bereits angesprochen, daß die Entwicklung des Virus im ZNS eine andere als im peripheren Blut sein kann, wodurch neue Varianten entstehen könnten. Die Wirkung von Medikamenten im ZNS muß vor diesem Hintergrund kritisch geprüft werden, um eine mögliche Neuverbreitung des Virus in den Organismus zu verhindern (Groothuis, D. R. und Levy, R. M., 1997). Die Aufnahme von Medikamenten ins ZNS kann durch die Blut-Hirn-Schranke behindert sein und die Verfügbarkeit dort ist im Allgemeinen deutlich geringer als im Blut (Enting, R. H. et al., 1998).

Die Virus-Zell-Interaktion in Astrozyten ist einzigartig, da Astrozyten in der Lage sind, die Replikation von HIV zu reprimieren. Die Aufklärung dieses „natürlichen Resistenzmechanismus“ verspricht wichtige Erkenntnisse über die Regulation des Virus und birgt wertvolle therapeutische Ansätze. Die Inhibition der Rev-Regulation als frühem Schritt der viralen Replikation ist ein weites Forschungsgebiet für die Therapie; viele Ansätze zeigten, daß durch die Expression von antisense-RNS, spezifischen Oligonukleotiden, transdominantem Rev-Protein oder kleinen inhibitorischen Molekülen die Rev-Funktion und damit die HIV-Replikation drastisch vermindert werden kann (zusammengefaßt in (Heguy, A., 1997) (Nakaya, T. et al., 1997) (Amado, R. G. et al., 1999)). Ein natürlich vorkommender inhibitorischer Effekt könnte zur Verfügbarkeit eines Medikamentes in den Zellen und Verträglichkeit einer Therapie wesentlich beitragen.

## 2. ZIELSETZUNG

HIV infiziert nicht nur Zellen des Immunsystems, sondern auch Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Symptome der Infektion sind neurologische Störungen, die bis hin zur schweren Demenz reichen. Zu den Zielzellen von HIV im ZNS gehören neben Makrophagen und Mikrogliazellen auch Astrozyten. Jedoch werden Astrozyten nicht produktiv infiziert, sondern zeigen nur eine geringe Virusreplikation. Die Expression viraler Proteine beschränkt sich hauptsächlich auf frühe Genprodukte wie die regulatorischen Proteine Rev und Tat sowie Nef.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß die Restriktion der Virusproduktion in Astrozyten auf eine verminderte Funktion des viralen Regulatorproteins Rev zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu Kontrollzellen, in denen Rev hauptsächlich im Zellkern und in den Nukleoli lokalisiert ist, findet man in Astrozyten das Rev-Protein auch zu einem großen Teil im Zytoplasma. Die Rev-abhängige Transaktivierung der viralen Strukturproteinsynthese ist in Astrozyten gegenüber produktiv infizierbaren Kontrollzellen um etwa einen Faktor 10 vermindert. Die Studien wurden mit Hilfe eines HIV-abgeleiteten Reportersystems durchgeführt, das die Rev-Transaktivierung anhand der Expression des HIV-Strukturproteins p24<sup>Gag</sup> mißt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus dieser verminderten Rev-Transaktivierung weiter aufzuschlüsseln. Dazu sollte die Transaktivierung zunächst mit Hilfe eines heterologen Reportersystems verifiziert werden. Unter Verwendung des Reportergens *cat* sollte ein möglicher Einfluß von im Reportersystem enthaltenen HIV-Sequenzen selber und eine mögliche Abhängigkeit der Regulation vom Spleißen der Transkripte untersucht werden.

Die N-terminale funktionelle Domäne von Rev vermittelt neben dem Import von Rev in den Zellkern die Bindung an seine Ziel-RNS sowie die Rev/Rev-Oligomerisierung. Unter Verwendung eines *in vivo* Systems sollten diese Eigenschaften aus dem komplexen Rev-Regulationszyklus ausgekoppelt und so ihre Funktionalität geprüft werden. Als Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Testsystems in Astrozyten sollte zunächst die Funktionalität des viralen Transkriptionsaktivators Tat in allen verwendeten Zelllinien analysiert werden. Die Spezifität der Rev/RNS-Bindung sollte in Kompetitionsstudien mit verschiedenen Kompetitorsubstanzen verifiziert werden.

Die Experimente sollten es ermöglichen, den Angriffspunkt für eine Inhibition der Rev-Transaktivierung in Astrozyten einzugrenzen und möglicherweise auf eine funktionelle Domäne des Proteins oder ein Zellkompartiment zu beschränken. Dabei sollte auf die Verwendung von *in vivo* Analysesystemen Wert gelegt und die Daten für verschiedene Astrozytomzelllinien bestätigt werden.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Transiente Transfektionen von Zelllinien

##### 3.1.1. Durchführung von Transfektionen eukaryotischer Zelllinien

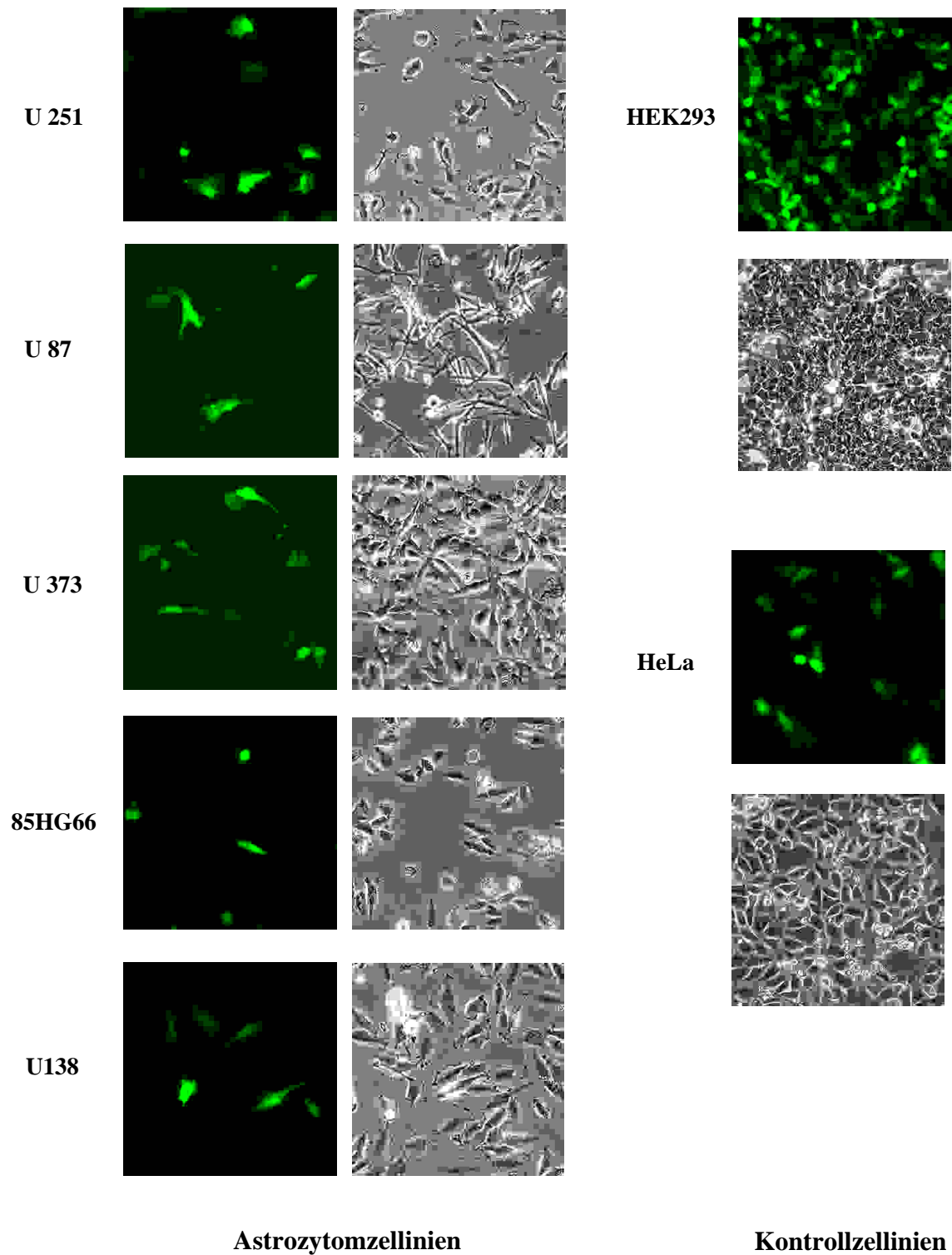
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren wesentlich auf transienten Transfektionen eukaryotischer Zelllinien (Astrozytom- und Kontrollzelllinien) nach der  $\text{CaPO}_4$ -Methode und der Bestimmung von Reporteraktivitäten (vgl. Kap. 6.2.1.4.1. und 6.2.3.). Der Aufbau der Transfektionen und die Kontrollen der Transfektionseffizienz waren in allen Experimenten ähnlich, daher wird zunächst eine kurze Übersicht gegeben.

Es wurde darauf geachtet, für die Transfektionen keine Zelllinien zu verwenden, die länger als 30 Passagen in Kultur gehalten wurden. Andernfalls können sog. Alterungseffekte bei den Zellen auftreten. Mit längerer Passagendauer können die Zellen ihre Expressionsmuster verändern; beispielsweise reduziert die Astrozytomzelllinie U251 mit steigender Passagenzahl die Expression des für Astrozyten spezifischen Oberflächenproteins GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Eva Ludwig, GSF, Neuherberg, persönliche Mitteilung).

Die Zellen wurden in der Regel mit einem Reportergenkonstrukt (im Rahmen dieser Arbeit meist zur regulierten Expression des *cat*-Gens), einem oder mehreren Effektorplasmiden (z. B. Rev- oder Tat-Expressionsplasmid), einem GFP (green fluorescent protein) exprimierenden und einem Luciferase exprimierenden Plasmid kotransfiziert. Dabei standen die GFP- und Luciferase-Expression unter vom eigentlichen Testsystem (und insbesondere dem Effektor) unabhängiger Promotorkontrolle.

Die Expression von GFP ermöglichte es, den Prozentsatz transfizierter Zellen zu ermitteln. Das Plasmid pFred143 enthält das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Unter Anregung mit UV-Licht zeigen GFP-exprimierende Zellen grüne Fluoreszenz (eine Zusammenfassung zu GFP findet sich in (Tsien, R. Y., 1998)). Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops visualisiert (vgl. Kap. 6.2.4.3.) und so der Prozentsatz transfizierter Zellen abgeschätzt.

Abbildung 7 zeigt die Effizienz einer  $\text{CaPO}_4$ -Transfektion in den verwendeten Zelllinien. Sie lag zwischen etwa 10% für 85HG66-Zellen und 80 bis 90% für HEK293-Zellen. Die Abbildung zeigt die Zellen 12 Stunden nach einer Transfektion zur Bestimmung der Rev-Transaktivierung (Kap. 3.2.). pFred143 wurde mit dem CAT-Expressionsplasmid pDM128, pGL3-RFB zur Luciferase-Expression und pBSPL als Leerplasmid transfiziert (vgl. Kap. 3.2.; 6.2.1.4.1.; 6.1.2.).



**Abb. 7:** Die Transfektionseffizienz der  $\text{CaPO}_4$ -Transfektion in den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien am Beispiel der GFP-Expression.



Die Luciferase-Messungen dienten zur Kontrolle für die Expressionsaktivität der jeweils verwendeten Zelllinie und für die Transfektionseffizienz. Da für jeden Ansatz die gleiche Menge Luciferase-Plasmid verwendet wurde, sollten sich die Luciferase-Messwerte innerhalb einer Zelllinie nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Der Schwellenwert für die Abweichung wurde auf 50% festgesetzt; darunter fallen sowohl verschiedene Ansätze einer Transfektion als auch Paralleltransfektionen mit demselben Transfektionsgemisch und Doppelbestimmungen. Wichen die Werte mehr als 50% voneinander ab, so lag der Schluß nahe, daß der Transfektionsansatz einen Einfluß auf die Zellen hatte. Insbesondere der Vergleich der Luciferase-Werte einzelner Ansätze zu dem Luciferase-Wert einer parallelen Transfektion nur mit Luciferase-Plasmid gibt wichtige Auskünfte darüber, ob z. B. eines der im Transfektionsmix vorhandenen Plasmide selber oder von den Plasmiden kodierten Proteine einen toxischen Einfluß auf die Zellen haben könnte.

In dieser Arbeit wurden Luciferase-Plasmide unter Kontrolle des Rous-Sarkom-Virus (RSV)- bzw. Reilley-Finkel-Biskis-Virus (RFB)-Promotors verwendet. Beide Promotoren stammen aus C-Typ Retroviren; RSV ist ein Retrovirus des Huhns und RFB der Maus (vgl. Kap. 6.1.2. und Abb. 8, pRSVluc und pGL3-RFB). Der RFB-Promotor führte in allen Zelllinien zu einer stärkeren Luciferase-Expression (Daten nicht gezeigt). Insbesondere in Zelllinien mit geringer Transfektionseffizienz war daher die Verwendung von pGL3-RFB gegenüber pRSVluc von Vorteil. Auf die Luciferase-Messungen wird im Zusammenhang mit den einzelnen Experimenten eingegangen.

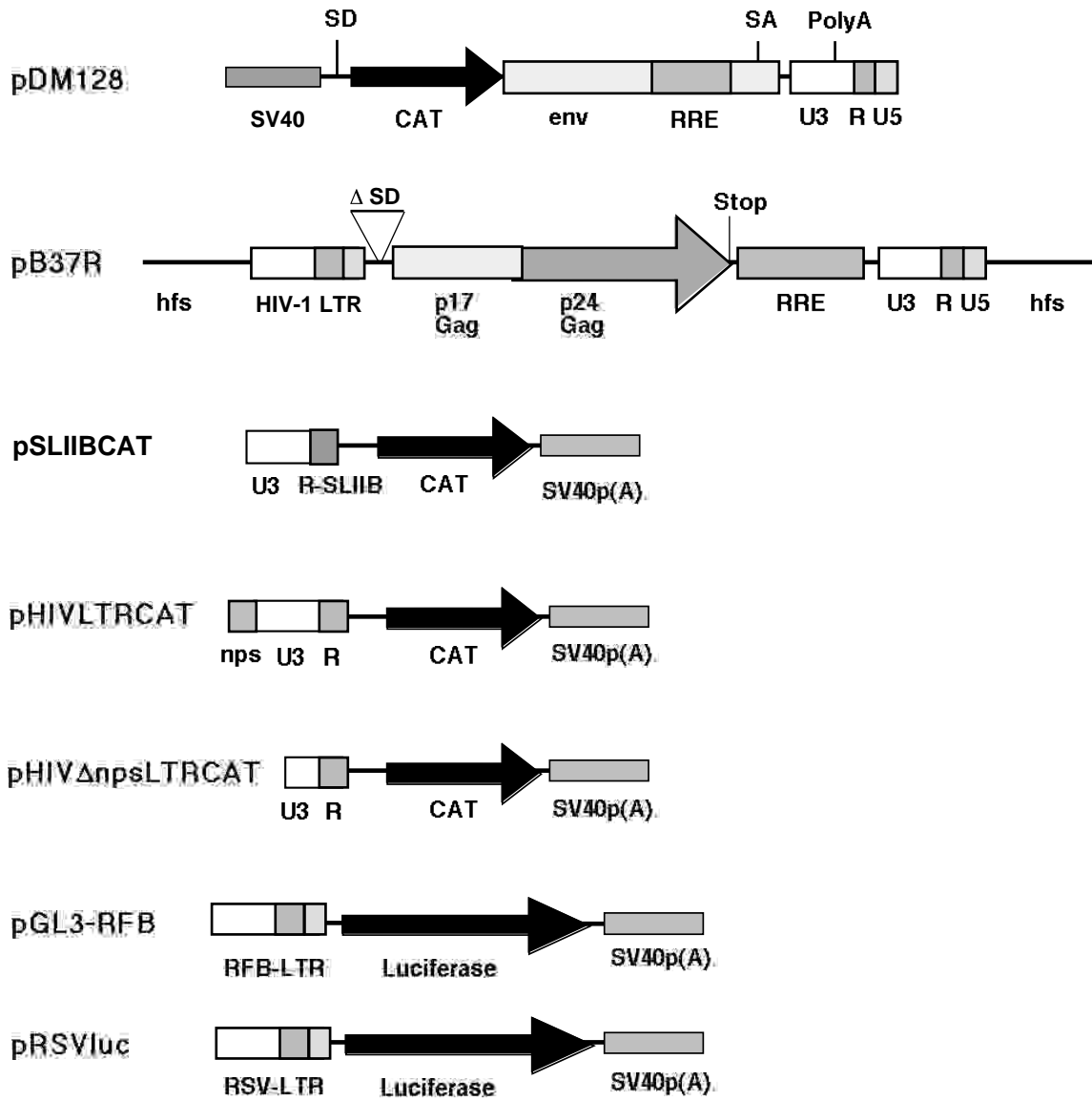
### **3.1.2. Für die Transfektionen verwendete Plasmide**

Abbildung 8 faßt die in dieser Arbeit verwendeten Reporterplasmide (Abb. 8A) und Expressionsplasmide (Abb. 8B und 8C) zusammen. Insbesondere unterscheiden sich die Promotoren der Expressionsplasmide (im wesentlichen CMV-Promotor oder HIV-LTR). Zudem soll verdeutlicht werden, daß die für die Bindungs- und Oligomerisierungsstudien (Kap. 3.4. und 3.6.) verwendeten Effektorplasmide bis auf die jeweils kodierenden Sequenzen identisch sind. Dieses Vorgehen trägt zur Vergleichbarkeit der Daten untereinander bei. Die Rev-kodierenden Sequenzen sind hauptsächlich aus dem HIV-1 Isolat HXB-3 abgeleitet. Lediglich RevM10BL und die Rev-Sequenz in pCsRevGFP wurde aus dem HIV-1 Isolat HXB-2 abgeleitet.

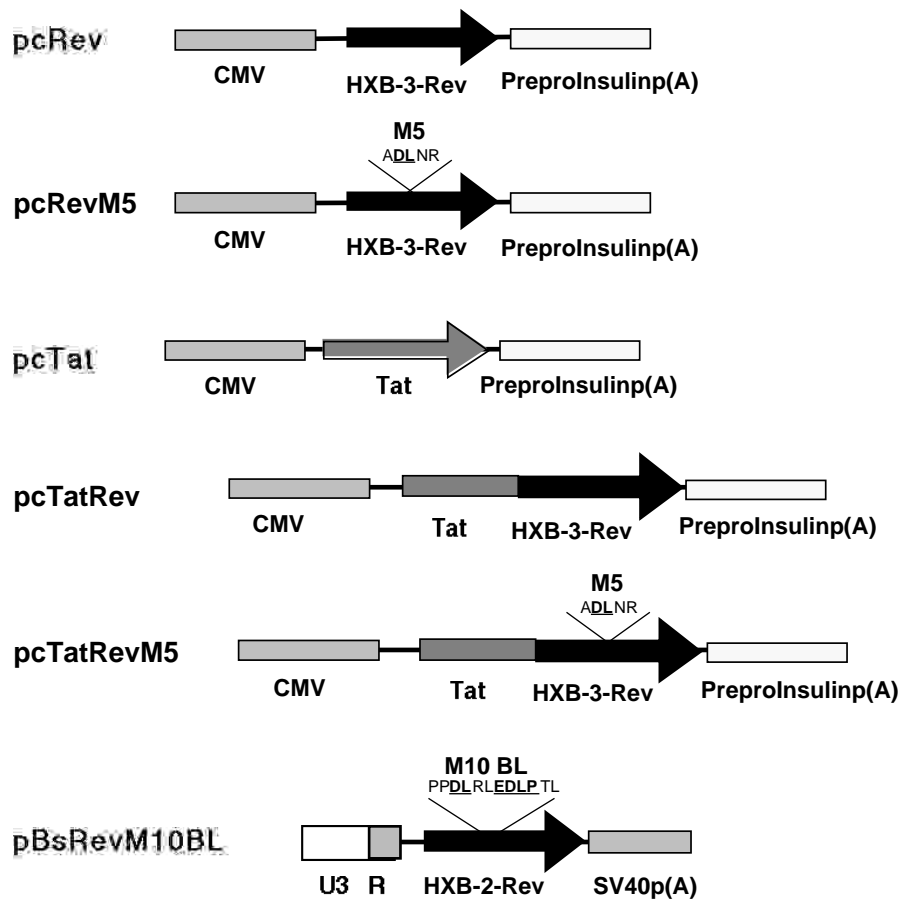
Genauere Information zur Herstellung und Herkunft der einzelnen Plasmide finden sich in Kap. 6.1.2.

**Abb. 8 (folgende Seiten):** Die Abbildung gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. SD – Spleißdonor, SA – Spleißakzeptor, hfs – human flanking sequences.

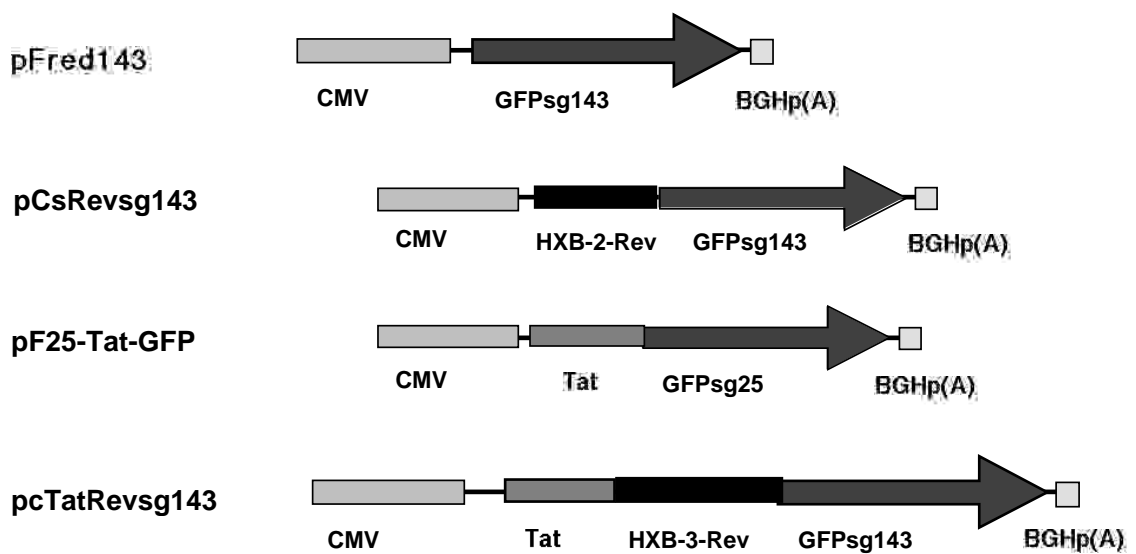
### A Reportergenkonstrukte



## B Effektorplasmide



## C GFP-Konstrukte



### 3.2. Die Rev-abhängige Transaktivierung der Expression des Reportergens *cat* in humanen Astrozyten

Bisherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, daß die Transaktivierung der Rev-abhängigen Proteinsynthese in Astrozyten um etwa einen Faktor 10 schwächer ist als in Kontrollzelllinien (Ludwig, E. et al., 1999). Für diese Experimente wurde ein Testsystem verwendet, das auf transienten Transfektionen beruht und in dem das HIV-1 p24<sup>Gag</sup>-Strukturprotein Rev-abhängig exprimiert wird (Kap. 1.1.2.2.2.). Im Gegensatz dazu beschrieben Gorry et al. unter Verwendung eines CAT-Reporterassays eine unverminderte Rev-Transaktivierung in der Astrozytomzelllinie U251 im Vergleich zu HeLa-Kontrollzellen (Gorry, P. R. et al., 1999). Ferner wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere CAT-Reportersysteme zur Untersuchung funktioneller Eigenschaften der viralen Regulatorproteine Rev und Tat verwendet (Kap. 3.3. bis 3.6.).

Damit ergaben sich zwei zentrale Fragestellungen:

- Ist die verminderte Rev-Transaktivierung in Astrozyten unter Umständen auf einen Einfluß des Testsystems selber und/oder in den verwendeten Plasmiden enthaltener HIV-Sequenzen zurückzuführen? In der Literatur wurde verschiedentlich ein Einfluß der HIV-RNS selbst auf die Rev-Abhängigkeit der Expression nachgewiesen (Sakai, H. et al., 1995) (Schwartz, S. et al., 1992). Daher wurde die Rev-Funktion mit Hilfe eines nicht-HIV-abgeleiteten Reportersystems in Astrozyten untersucht.
- Kann ein Einfluß des CAT-Testsystems oder einzelner Komponenten daraus auf die Testergebnisse in Astrozyten ausgeschlossen und damit die Verwendbarkeit von CAT als Reportergen in Astrozyten sichergestellt werden?

Zur Untersuchung der Rev-Transaktivierung im Rahmen dieser Arbeit wurde das von Gorry et al. beschriebene CAT-Reportersystem benutzt (Gorry, P. R. et al., 1999). Das Reporterplasmid pDM128 (Abb. 8, S. 26, und Abb. 38, S. 79) enthält das *cat*-Gen unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Darüber hinaus sind Teile des *env*-Gens (abgeleitet aus dem HIV-1 Stamm SF2) einschließlich der RRE enthalten. Das Konstrukt hat einen Spleißdonor und -akzeptor und somit ein einzelnes Intron, das das *cat*-Gen trägt. Ist in den Zellen Rev vorhanden, wird die ungespleißte mRNS zur Translation aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert. Ist kein Rev vorhanden, so wird die mRNS gespleißt und erst dann ins Zytoplasma transportiert. Sie enthält das Intron nicht mehr, und eine Translation des *cat*-Gens kann nicht stattfinden (Hope, T. J. et al., 1990).

Die Rev-abhängige Transaktivierung der Expression des *cat*-Reportergens in pDM128 wurde für die humanen Astrozytomzelllinien 85HG66, U138, U251, U373 und U87 im Vergleich zu den beiden Kontrollzelllinien HeLa und HEK293 untersucht (Informationen zu den Zelllinien und ihrer Herkunft finden sich in Kap. 6.1.1.). Dazu wurden die Zelllinien in Doppelansätzen mit pDM128 mit und ohne Effektorplasmid pcRev jeweils in Gegenwart des Rev-unabhängigen Reporterplasmids pGL3-RFB nach der CaPO<sub>4</sub>-Methode transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und die Acetylierungs- (Umsatz-) raten des CAT-Substrates Chloramphenicol durch das CAT-Enzym im funktionellen Test bestimmt (Kap. 6.2.3.4.). Die Werte wurden in Anlehnung an die

Bedingungen von Hope et al. auf die Expression der Luciferase als unabhängigem Reporter standardisiert (Hope, T. J. et al., 1990).

Als relative Einheit zum Vergleich der Stimulation der CAT-Expression durch Rev in den verschiedenen Zelllinien wurde die Induktion ermittelt (zur Berechnung und Definition der Induktion vgl. Kap. 6.2.3.3.). Dazu wurde die Chloramphenicol-Umsatzrate im Ansatz mit Rev (= aktivierter Wert) durch die Umsatzrate im Ansatz ohne Rev (= Basalwert) geteilt. Da in Abhängigkeit von der Transfektionsrate und Expressionsaktivität der Zellen unterschiedliche Proteinmengen und Inkubationszeiten in den Test eingesetzt wurden, sind die Umsatzzraten nur innerhalb einer Transfektion und einer Zelllinie miteinander vergleichbar, die verschiedenen Zelllinien und Einzelexperimente dagegen nur unter Verwendung der Induktionen.

Wichen die Luciferase-Werte innerhalb der verschiedenen Ansätze einer Transfektion (sowohl in den Doppelansätzen als auch im Vergleich der Ansätze mit bzw. ohne Rev) mehr als 50% voneinander ab, so wurde der Versuch nicht gewertet. Der Schwellenwert findet auch für die CAT-Umsätze aus den Doppelbestimmungen Anwendung.

### **3.2.1. Optimierung der Transfektionsbedingungen**

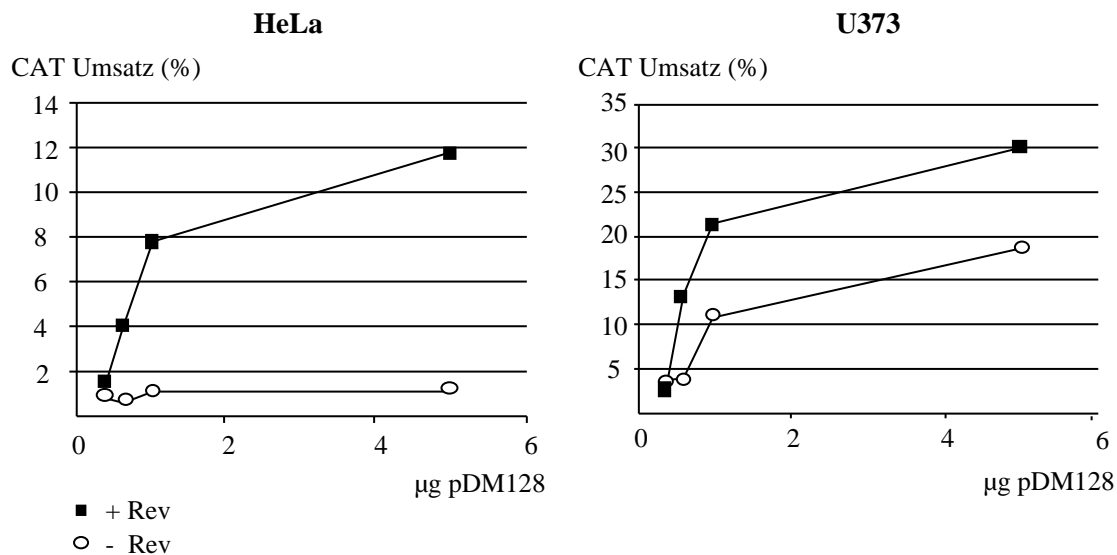
Da die Effizienz und somit die Aussagekraft eines Reporterassays in Zelllinien wesentlich von der Menge der einzelnen Plasmide und ihrem Verhältnis zueinander abhängt, wurden diese Konzentrationen zunächst titriert. Zu wenig Plasmid (Effektor- oder Reportergenkonstrukt) kann zu für die jeweilige Zelllinie suboptimalen Induktionen führen, da z. B. die Hintergrundexpression (ohne Effektor) unter der Nachweisgrenze liegt. Zu hohe Plasmidmengen dagegen führen zu einer Sättigung, in deren Folge die Transaktivierungen und damit auch die Induktionen sinken. Die Transfektion von zuviel Plasmid kann zu einer selektiven Akkumulation von Transkriptionsfaktoren an dem transfizierten Promotor führen, und die Zelle kann andere für sie wichtige Expressionsaktivitäten nicht mehr ausüben. Die Plasmidmenge steht nicht mehr in einem linearen Verhältnis zur Expression des Plasmides. Experimentell ist dies an einer Abnahme der Luciferase-Expression zu erkennen.

Die Menge an Plasmid pro Ansatz richtet sich nach der Transfektionsmethode und der Zelllinie. In Anlehnung an die Literatur, in der pDM128 als Reporterplasmid für die Rev-Transaktivierung verwendet worden ist, wurde das Verhältnis von pDM128 zu pcRev zunächst auf 3:2 festgelegt (Hope, T. J. et al., 1990) (Malim, M. H. et al., 1991) (Hua, J. et al., 1996) (Bogerd, H. P. et al., 1998). Zur Bestimmung der optimalen Plasmidmenge wurde in einem Vorversuch die Menge an pDM128 in U373-Astrozytomzellen und HeLa-Kontrollzellen zwischen 0,38 und 5 µg variiert, die Menge an pcRev entsprechend dem festgelegten Verhältnis 3:2 zwischen 0,25 und 3,33 µg.

Das Ergebnis der ersten CAT-Messung ist in Abbildung 9 gezeigt. Es wurden 8 µg der U373-Lysate und 10 µg der HeLa-Lysate in den funktionellen CAT-Test eingesetzt. Die Abbildung zeigt die Rohdaten als Prozent Substratumsatz durch das CAT-Enzym, aufgetragen gegen die Menge an pDM128 im jeweiligen Ansatz. Die Werte mit und ohne Rev sind in separaten

Kurven dargestellt. Tab. 1 faßt die zugehörigen Rohdaten aus der CAT- und der jeweils parallelen Luciferase-Messung zusammen.

In der Kontrollzelle HeLa blieb der CAT-Wert im Ansatz ohne Rev trotz steigender Menge pDM128 nahezu konstant. Dagegen stieg der induzierte Wert mit wachsender Menge Rev stetig an. In U373-Zellen dagegen stiegen beide Kurven mit der Effektormenge an. Diese Zelllinie zeigte also eine höhere Basalaktivität von pDM128 bereits ohne den Effektor.



**Abb. 9:** Die Abbildung zeigt die CAT-Umsätze aus einer Transfektion mit steigender Menge pDM128 mit und ohne pcRev. Für den Ansatz mit Rev wurden zwei Drittel der jeweiligen pDM128-Plasmidmenge an pcRev kotransfiziert. Dargestellt ist ein Vergleich zwischen HeLa-Kontrollzellen und U373-Astrozytomzellen. Für beide Zelllinien ist der uninduzierte Wert (ohne Rev) sowie der induzierte Wert (mit Rev) in Prozent Umsatz des CAT-Substrates als Kurve über die verschiedenen Plasmidkonzentrationen angegeben. Die Rohdaten sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

µg pDM128	0,38	0,38	0,6	0,6	1	1	5	5
µg pcRev	--	0,25	--	0,4	--	0,66	--	3,33
<b>U373</b>								
% CAT Umsatz	3,6	2,6	3,8	13,4	11	21,5	18,7	30,1
Luciferase (RLU)	34333	15076	37371	64210	76091	53401	19241	26923
<b>HeLa</b>								
% CAT Umsatz	0,83	1,7	0,7	4	1	7,5	1,2	11,9
Luciferase (RLU)	34471	37025	30924	47791	63301	41798	10608	12480

**Tab. 1:** Die Tabelle gibt die CAT-Rohdaten mit den verschiedenen Plasmidkonzentrationen aus Abb. 9 und den zugehörigen Luciferase-Werten pro 50 µg Gesamtprotein im Vergleich an. Die CAT-Umsätze wurden unter Verwendung von 8 µg Gesamtprotein für U373-Zellen und 10 µg Gesamtprotein für HeLa-Zellen ermittelt.

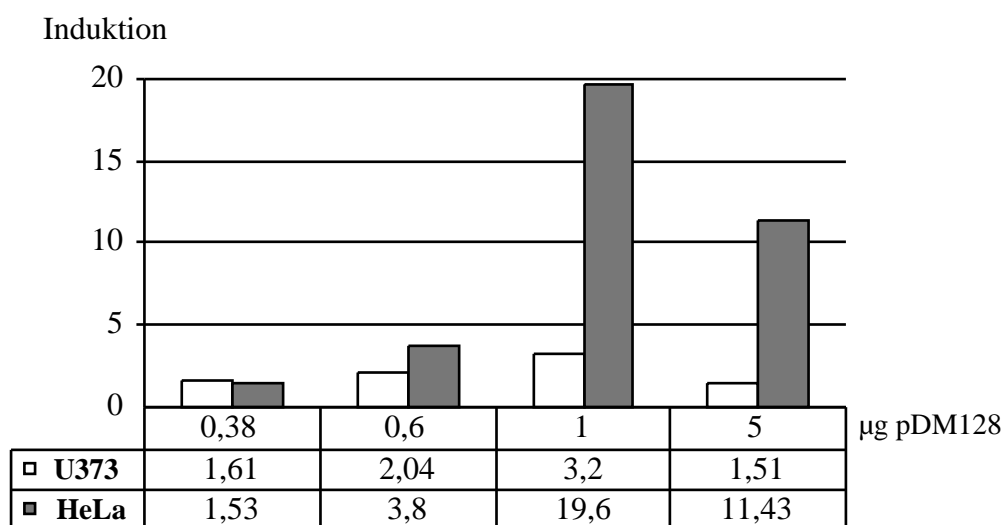
Die jeweiligen genauen Plasmidmengen sind in Tabelle 1 angegeben. Der Ansatz mit 0,38 µg pDM128 wies in U373-Zellen eine hohe Abweichung der Luciferase-Werte mit bzw. ohne Rev

auf (>50%) und wurde in keine weiteren Berechnungen mit einbezogen. Die Werte sind jedoch in diesem Zusammenhang mit aufgelistet, da sich zeigte, daß diese Plasmidkonzentration und damit die Aktivierung der CAT-Expression für die durchzuführenden Experimente zu gering war (in der Tabelle CAT-Umsätze mit Effektor von 2,6 und 1,7 Prozent).

Aufgrund der hohen Effektor-unabhängigen CAT-Expression in Astrozyten wurden zur Berechnung der Induktionen aus diesem Experiment verschiedene Verdünnungen der Proteinlysate für den CAT-Test eingesetzt (vgl. Kap. 6.2.3.4.). Dieses Vorgehen gewährleistet, daß innerhalb des Messbereiches die CAT-Menge aus dem Lysat proportional zum Substratumsatz ist (Kap. 6.2.3.4.). Bei diesem und in allen folgenden Experimenten zur Bestimmung einer Induktion im funktionellen CAT-Test wurde darauf geachtet, die Lysate so zu verdünnen, daß der Umsatz ohne Effektor zwischen 1 und 3 Prozent lag (Kap. 6.2.3.4.). Der Hintergrund der CAT-Messung in einem Ansatz ohne CAT-Reporterplasmid (mock-Transfektion) liegt bei 1%; Werte >1% sind reproduzierbar messbar. Der zugehörige Wert mit Effektor wurde in derselben Weise verdünnt; dabei sollte der induzierte Wert 50 Prozent Umsatz möglichst nicht überschreiten (vgl. auch das Beispiel in Kap. 6.2.3.4.).

Die Induktionen aus diesem Experiment sind in Abbildung 10 dargestellt. Die in die Berechnung der Induktionen eingegangenen Rohdaten sind auf die Luciferase-Werte standardisiert worden. Die maximale Induktion der CAT-Expression durch Rev ergab sich in beiden Zelllinien unter Verwendung von 1 µg pDM128 und 0,6 µg pcRev. Bei weiter steigenden Mengen pDM128 nahmen die Induktionen sowie die absoluten Luciferase-Werte wieder ab, was darauf hindeutet, daß die Plasmidmengen toxisch für die Zellen sind (Kap. 3.2.1.).

Aufgrund dieser Daten wurde die Plasmidmenge von pDM128 pro Ansatz im 60 mm Kulturschälchen auf 1 µg festgelegt. Im gezeigten Experiment wurde ein 6facher Unterschied in der Rev-abhängigen Induktion der Reporter-genaktivität in HeLa-Zellen (19,6) und U373-Zellen (3,2) festgestellt.



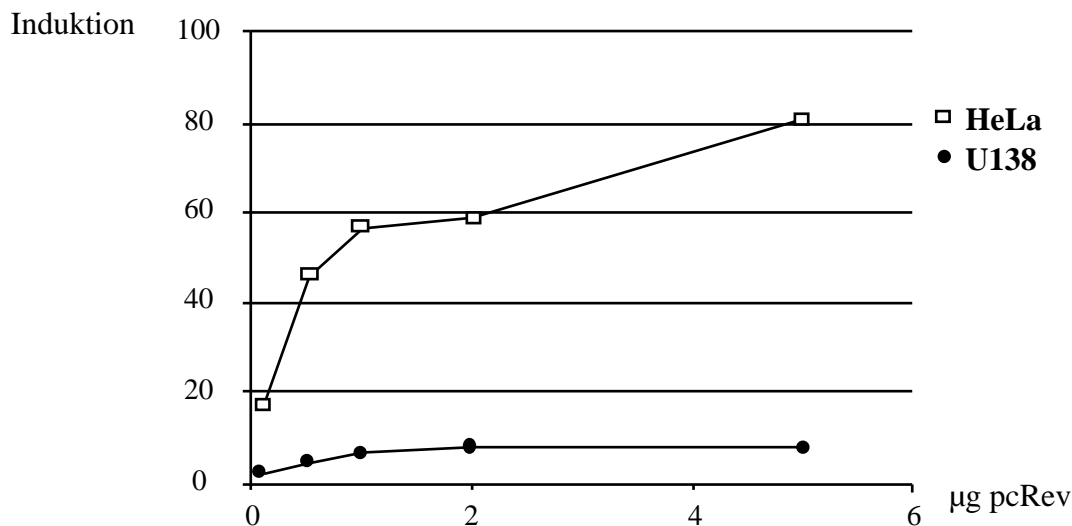
**Abb. 10** : Die Aktivierung der CAT-Expression durch Rev in Abhängigkeit der Menge an pDM128 in U373-Astrozytomzellen und HeLa-Kontrollzellen. Die genauen Induktionen sind in der Tabelle angegeben. Die Rohdaten wurden auf die Luciferase-Messungen standardisiert (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment wurde bei 1  $\mu\text{g}$  pDM128 die pcRev-Konzentration zwischen 0,1 und 10  $\mu\text{g}$  variiert. Es wurden HeLa-Kontrollzellen und U138-Astrozytomzellen verglichen. Die Induktionen sind in Abbildung 11 angegeben, Tab. 2 gibt die entsprechenden Werte und die Ergebnisse der Luciferase-Messungen im Einzelnen an.

Die Messungen ergaben wieder einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien. Die Kontrollzelllinie unterstützte die Rev-abhängige Reporterexpression bei pcRev-Konzentrationen zwischen 0,1 und 5  $\mu\text{g}$  um einen Faktor von 17,3 bis 80, die Astrozytomzelllinie nur um 2,1 bis 7,6. Steigende Mengen an Rev führten dabei in HeLa-Zellen zu einer weiteren Expressionssteigerung des Reportergens *cat*, in U138-Zellen blieb die Induktion ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}$  pcRev konstant. Die Kontrollzelllinie unterstützte im Vergleich zur Astrozytomzelllinie die Rev-Funktion durchschnittlich 8,9fach stärker. Diese Werte sind für die verschiedenen Ansätze in Tab. 2 unter „Induktion HeLa/U138“ als Quotient aus der Induktion in HeLa-Zellen und der Induktion in U138-Zellen angegeben. Auffällig ist, daß schon mit nur 0,1  $\mu\text{g}$  pcRev die Induktion in HeLa-Zellen 8,2fach höher ist als in der Astrozytomzelllinie.

Bei einer weiteren Steigerung der Menge an pcRev auf 10  $\mu\text{g}$  sank der Luciferase-Wert in HeLa-Zellen auf ein Drittel des Wertes ohne Rev, so daß diese Ansätze nicht mehr zu berücksichtigen waren. Auch für den Wert mit 5  $\mu\text{g}$  pcRev ist in beiden Zelllinien schon ein deutlicher Rückgang der Luciferase-Werte zu verzeichnen. Diese Plasmidmengen sind offensichtlich toxisch für die Zellen. Die Berichtigung um den niedrigen Luciferase-Wert erhöht die Induktion in HeLa-Zellen auf 80.

Ein ähnliches Experiment wurde für U373- und HeLa-Zellen durchgeführt. Es wurden Konzentrationen von 0,05 bis 1  $\mu\text{g}$  Rev verwendet. Während die Induktion in HeLa-Zellen kontinuierlich auf 25 stieg, stagnierte die Induktion für U373-Zellen bei 3 (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 11:** Aktivierung der Expression des Rev-abhängig regulierten Reportergens *cat* im Plasmid pDM128 durch steigende Mengen Rev. Dargestellt ist ein Vergleich zwischen HeLa-Kontrollzellen und U138-Astrozytomzellen. Die angegebenen Induktionen berechneten sich aus den Werten eines in Doppelansätzen ausgeführten Experimentes und wurden auf die Luciferase-Werte standardisiert.



	<b>µg pcRev</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
<b>HeLa</b>	Induktion	17,3	45,8	56,2	58,8	80,7
	Luciferase (RLU)	32630	32454	23283	33213	19921
<b>U138</b>	Induktion	2,1	4,6	6,9	7,6	7,6
	Luciferase (RLU)	202988	263762	224208	198519	189497
<b>Ind. HeLa/U138</b>		8.2	9.8	8.2	7.7	10.6

**Tab. 2:** Die Tabelle zeigt die Induktionen aus Abb. 11 mit den zugehörigen Luciferase-Werten aus den einzelnen Ansätzen zum Vergleich.

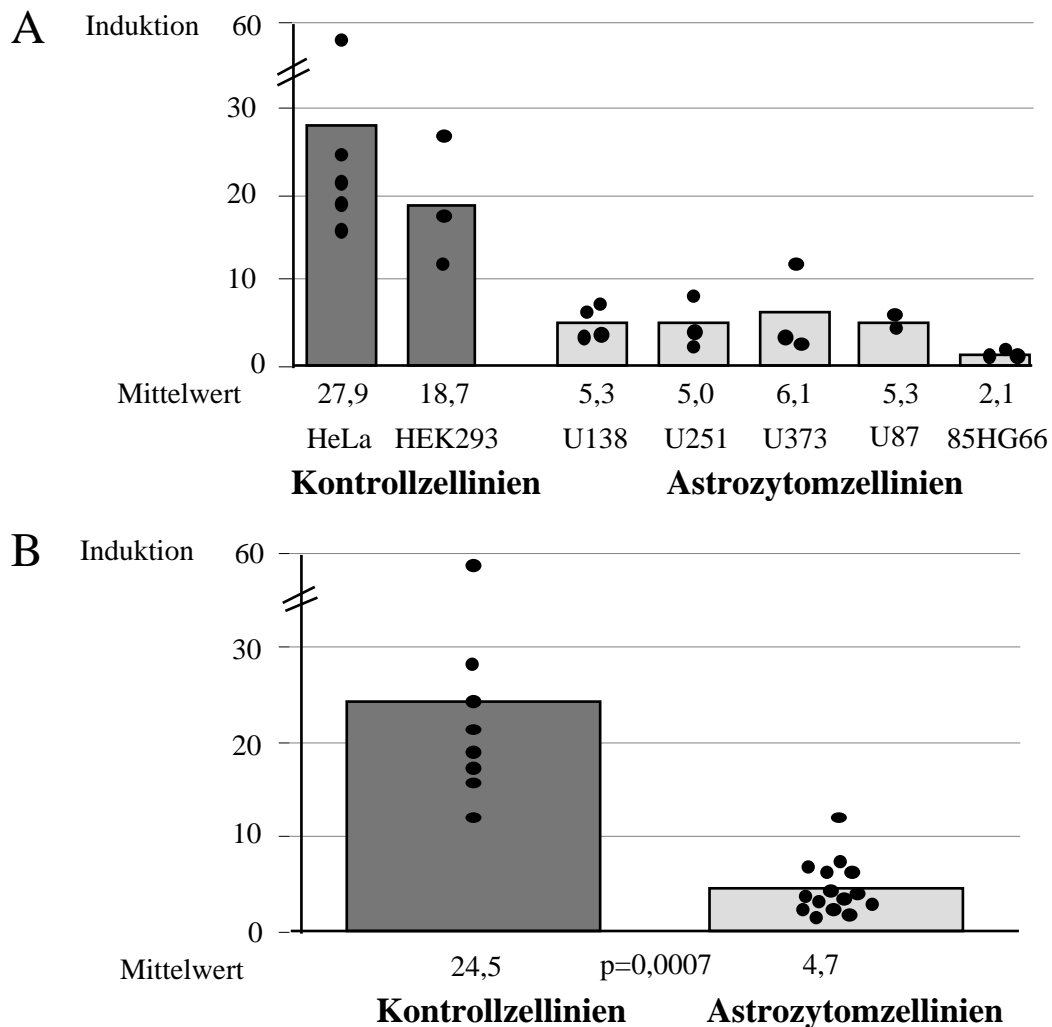
Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Standardkonzentrationen der Plasmide in den Transfektionen zur Prüfung der Transaktivierungseigenschaften von Rev auf 1 µg pDM128 und 2 µg pcRev festgelegt. Diese Konzentrationen gewährleisteten eine gleichbleibende Transkriptionsaktivität in den Zellen (vgl. insbesondere den Luciferase-Wert in HeLa-Zellen für 5 µg pcRev, der nur noch 60% des Wertes für 0,1 µg beträgt). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die Induktion in der Astrozytomzelllinie U138 bei dieser Konzentration ein Maximum erreicht hat. Eine weitere Steigerung der Menge an Rev in den Zellen führte zu keiner weiteren Erhöhung der Transaktivierung.

Für die Zelllinien U373 und HeLa konnte gezeigt werden, daß die Steigerung der Menge an pDM128 zu keiner weiteren Erhöhung der Induktion führt. Es konnte somit auch ausgeschlossen werden, daß die CAT-Expression durch die Menge an Reporterplasmid limitiert wird.

### ***3.2.2. Die Rev-abhängige Transaktivierung der Expression des Reportergens cat ist in humanen Astrozytomzelllinien vermindert***

Zur Untersuchung der Rev-Transaktivierung wurden pro Zelllinie zwischen zwei und fünf unabhängige Transfektionsexperimente in Doppelansätzen durchgeführt. Die Induktionen berechneten sich nach Normalisierung der Werte auf die Luciferase-Daten als Erhöhung der Basalaktivität von pDM128 durch die Rev-abhängige Regulation.

Abbildung 12A zeigt die Induktionen für die einzelnen Zelllinien. Der Mittelwert der Induktionen in den Kontrollzelllinien betrug 27,9 und 18,7, die mittleren Induktionen aus den Astrozytomzelllinien lagen zwischen 2,1 und 6,1. Zusammengefaßt war die Rev-abhängige Transaktivierung im Mittel von 15 Werten aus fünf verschiedenen Astrozytomzelllinien mit 4,7 um einen Faktor von 5,2 niedriger als das Mittel der acht Werte aus den beiden Kontrollzelllinien mit 24,5 (Abb. 12B).



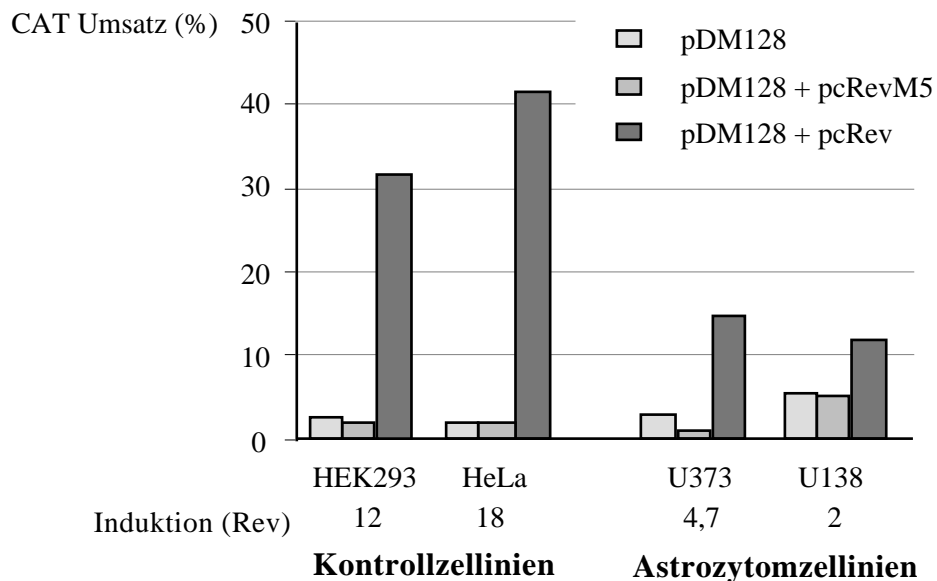
**Abb. 12:** Transaktivierung der CAT-Expression durch den viralen Regulator Rev in Astrozytom- und Kontrollzelllinien. A stellt die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien dar, B faßt die Astrozytom- bzw. Kontrollzelllinien zusammen. Punkte kennzeichnen Einzelerperimente in Doppelansätzen, Säulen den Mittelwert.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der GraphPad PRISM® Software statistisch ausgewertet (Kap. 6.2.4.1.). Mit  $p = 0,0007$  ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Ergebnisgruppen, die einer Gauß'schen Normalverteilung entsprechen (Kap. 6.2.4.1.).

Das in Abbildung 11 (S. 32) dargestellte Experiment, in dem die Menge an Rev-Expressionsplasmid titriert wurde, zeigte, daß in U138-Zellen eine Steigerung der pcRev-Menge auf mehr als 2 µg keine weitere Aktivierung der CAT-Expression zur Folge hatte. Daher konnte ausgeschlossen werden, daß die geringere Induktion in Astrozyten im Vergleich zu Kontrollzellen auf eine geringe Expression und damit Verfügbarkeit von Rev in diesen Zellen zurückzuführen ist.

Eine Bestätigung der Spezifität der Daten ergab sich aus den Experimenten, die in Abbildung 13 für zwei Kontroll- und zwei Astrozytomzelllinien dargestellt sind. Bei der Kotransfektion von pDM128 mit der Bindungs-defekten Mutante RevM5 anstelle des Rev-Wildtyps ergab sich keine Steigerung der Basalaktivität aus dem Ansatz pDM128 ohne Effektor. Die beiden Plasmide pcRev und pcRevM5 sind identisch bis auf einen Austausch von sechs

Nukleotiden an Position 110-115 der Rev-Sequenz in pcRevM5 (vgl. Kap. 6.1.2. und Abb. 8, S. 27). Der Austausch führte zur Veränderung der Aminosäuren 38 und 39 in der RNS-Bindungsdomäne von RR nach DL (vgl. auch Abb. 4, S. 9). Die Verwendung der Mutante als Spezifitätskontrolle wurde für alle verwendeten Zelllinien durchgeführt, wobei in keinem Versuch eine Aktivierung durch RevM5 beobachtet werden konnte. Damit konnte bestätigt werden, daß die beobachtete Aktivierung der CAT-Expression nur auf den Einfluß von Rev zurückzuführen ist.



**Abb. 13:** Die Rev-abhängige Transaktivierung des Reporergens *cat* in den Kontrollzelllinien HEK293 und HeLa sowie den Astrozytomzelllinien U373 und U138. Dargestellt ist der CAT-Umsatz in Prozent nach Transfektion von pDM128 ohne Effektor, mit wtRev bzw. der Bindungs-defekten Mutante RevM5. Die Werte wurden auf die Luciferase standardisiert, die Induktionen sind zum Vergleich angegeben.

Darüber hinaus konnte die Transaktivierung von pDM128 durch Koftransfektion mit einem weiteren RRE-enthaltenden Plasmid gehemmt werden (Daten nicht gezeigt). Auch dieses Ergebnis bestätigt die Spezifität der Aktivierung. Die zusätzlichen RRE-Sequenzen kompetieren mit der CAT-RNS um die Rev-Bindung.

Die Experimente konnten zeigen, daß die Transaktivierung des Rev-abhängig exprimierten Reportergenkonstruktes pDM128 in humanen Astrozytomzelllinien gegenüber der Transaktivierung in Kontrollzelllinien signifikant vermindert ist.

### 3.2.3. Die Lokalisation von RevM5

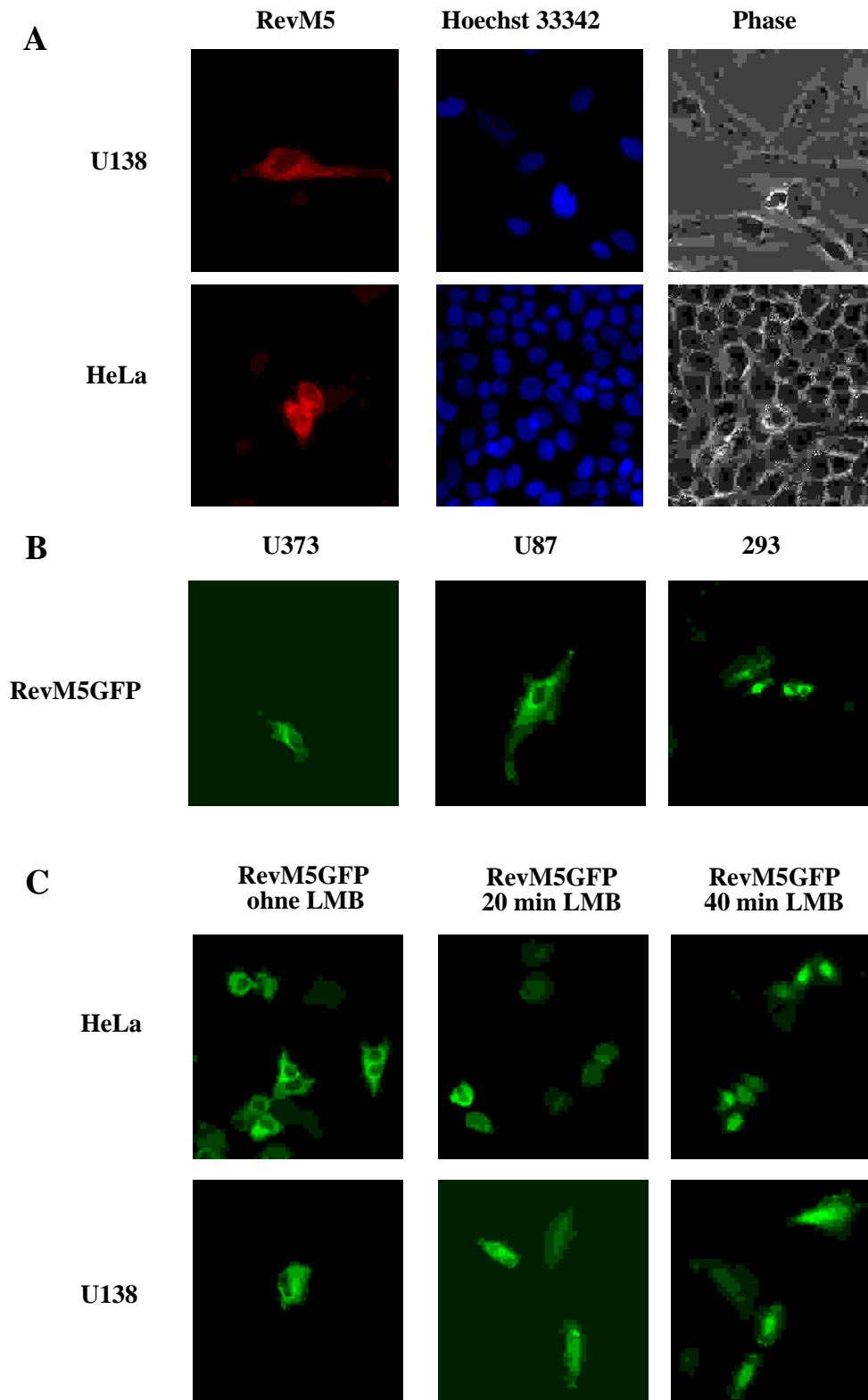
RevM5 wurde im wesentlichen von Malim et al. charakterisiert (Malim, M. H. et al., 1989) (Malim, M. H. und Cullen, B. R., 1991). Die Lokalisation von RevM5 wurde als größtenteils zytoplasmatisch beschrieben, eine Bindung an die RRE konnte nicht festgestellt werden. RevM5 ist nicht funktionell (Kap. 1.1.2.2.2.). Durch die Mutation ist sowohl die RNS-Bindungs- als

auch die Kernimport-Domäne betroffen. Da RevM5 im weiteren Verlauf dieser Arbeit im Oligomerisierungstest für Rev (Kap. 3.6.) noch verwendet wird, wurden die Eigenschaften dieser Mutante insbesondere in Astrozyten näher charakterisiert. Dazu wurde zunächst die Lokalisation von RevM5 in Astrozyten und Kontrollzellen ermittelt. Ferner wurde geprüft, ob das Importsignal völlig inaktiviert ist oder ob ein Teil von RevM5 noch im Zellkern verfügbar ist. Diese Verfügbarkeit gibt wichtige Hinweise darauf, ob die Funktionslosigkeit von RevM5 wesentlich auf die fehlende Bindung oder auch auf die Akkumulation im Zytoplasma zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Lokalisation von RevM5 wurde zunächst in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abb. 14A, für HeLa- und U138-Zellen). Da sich jedoch in der Literatur Hinweise darauf fanden, daß die Fixierung und Permeabilisierung von Zellen die Proteinlokalisierung verändern kann (Lee, S. et al., 1999) (Szilvay, A. M. et al., 1997), wurde die Lokalisation in lebenden Zellen anhand eines RevM5GFP-Fusionsproteins bestätigt (Abb. 14B). Beide Nachweismethoden zeigten deutlich die Lokalisation von RevM5 im Zytoplasma von Astrozyten und Kontrollzellen.

Allerdings kann anhand der Ergebnisse aus Abbildung 14 A und B keine klare Aussage gemacht werden, ob RevM5 ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert ist oder zu einem geringen Teil auch im Zellkern vorliegt. Der Anteil im Kern kann unter der Nachweisgrenze der Methode liegen. Bestimmt man beispielsweise die Lokalisation von Rev in HeLa-Zellen, so findet man es im Zellkern und in den Nukleoli; Rev ist aber ein shuttle-Protein und muß zur Erfüllung seiner Funktion auch im Zytoplasma lokalisieren (Kap. 1.1.2.2.2.).

Um die Akkumulation im Kern zu fördern, wurden U138- und HeLa-Zellen zusätzlich mit Leptomycin B (LMB) behandelt (Abb. 14C). LMB inhibiert den Export von Rev durch spezifische Interaktion mit dem Exportrezeptor CRM1 (vgl. Kap. 1.1.2.2.2.). LMB wurde in einer Konzentration von 10 nM ins Medium gegeben, eine deutliche Akkumulation von RevM5GFP im Zellkern war nach 20 bis 40 min festzustellen. Nach 20 min mit LMB stellte sich in HeLa-Zellen eine stärkere Färbung im Außenbereich des Zellkerns ein (vgl. die beiden Zellen rechts im Bild, gut sichtbar durch die schwächere Gesamtfluoreszenz). Nach 30 min befand sich RevM5GFP in jedem Zellkern. In U138-Zellen erkannte man schon nach 20 min eine gleichmäßige Färbung, nach 40 min war das Zytoplasma deutlich schwächer gefärbt als der Zellkern.



**Abb. 14:** Die Lokalisation von RevM5 in Kontrollzellen und Astrozyten. A zeigt die Lokalisation von RevM5 in der indirekten Immunfluoreszenz. B zeigt die Lokalisation von RevM5GFP in lebenden Zellen. C zeigt am Beispiel von HeLa-Kontrollzellen und U138-Astrozytomzellen die Akkumulation von RevM5GFP im Zellkern durch die Behandlung mit 10 nM LMB über einen Zeitraum von 40 min. Die Transfektionen wurden mit dem FuGENE 6-Transfektionsreagenz durchgeführt (Kap. 6.2.1.4.2.).

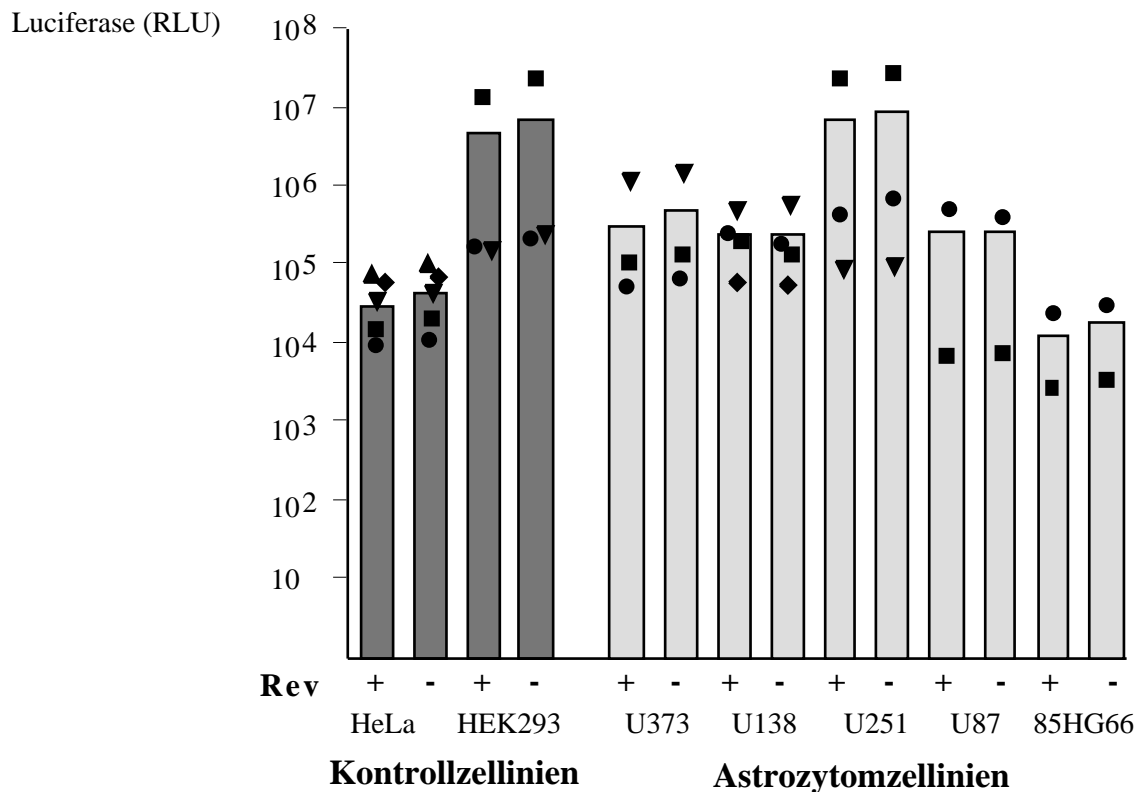
Somit konnte bestätigt werden, daß die Lokalisation von RevM5 in Astrozyten der Lokalisation in Kontrollzellen entspricht und daß das Protein prinzipiell in der Lage ist, in den Zellkern importiert zu werden. Die Importaktivität ist demnach nicht wie die Bindungskapazität ganz ausgeschaltet, sondern beeinträchtigt.

#### ***3.2.4. Der Einfluß von Rev auf einen unabhängigen Promotor***

In jeder der in Kapitel 3.2.2. gezeigten Transfektionen wurde pGL3-RFB als Rev-unabhängiger Reporter kotransfiziert. Das Plasmid enthält den LTR-Promotor eines C-Typ Retrovirus der Maus, Reilley-Finkel-Biskis, der die Expression der Firefly-Luciferase steuert. Die Luciferase-Werte wurden für jedes Zellsat bestimmt und durften sowohl innerhalb der Doppelbestimmungen als auch für die Ansätze mit bzw. ohne Rev nicht mehr als 50% voneinander abweichen, andernfalls wurde das Experiment nicht berücksichtigt. Dadurch wird eine gleichmäßige Transkriptionsaktivität der Zellen in den verschiedenen Ansätzen gewährleistet und es werden gleichzeitig Hinweise auf einen möglichen Einfluß von Rev auf die generelle Transkriptionsaktivität der Zellen erhalten. Bond et al. beschrieben einen toxischen Einfluß von Rev, der die Expression von Reportergenen (Luciferase,  $\beta$ -Galaktosidase) in Zelllinien signifikant senkte (Bond, V. C. et al., 1997).

Die Ergebnisse der Luciferasemessungen aus den in Kap. 3.2.2. beschriebenen Transaktivierungsexperimenten sind in Abbildung 15 dargestellt. Die Werte wurden jeweils auf 50  $\mu$ g Gesamtprotein standardisiert. Es zeigte sich, daß die Anwesenheit von Rev keine Auswirkung auf die allgemeine Transkriptionsaktivität der Zellen hatte. Damit war sichergestellt, daß Rev – zumindest in den hier verwendeten Konzentrationen - keinen toxischen Einfluß auf die Expressionsaktivität der Zellen ausübt.

Darüber hinaus zeigten die Daten, daß die Zellen sich prinzipiell in ihrer Aktivität unterscheiden. So sind beispielsweise die durchschnittlichen Luciferase-Werte in U251-Zellen um einen Faktor 1000 höher als die Luciferase-Werte in 85HG66-Zellen. Diese Beobachtung verdeutlicht abermals die Notwendigkeit, Zelllinien nicht anhand der absoluten Messdaten, sondern mittels einer relativen Größe wie der Induktion zu vergleichen.



**Abb. 15:** Die Expression des Reportergens *luciferase* in den verschiedenen Zelllinien. Die Werte wurden parallel zum CAT-Umsatz in den Experimenten zur Rev-Transaktivierung gemessen. Für jede Zelllinie wurden die Luciferase-Werte (in relativen Licht-Einheiten (RLU) pro 50 µg Gesamtprotein) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Rev verglichen. Gleiche Symbole kennzeichnen Werte aus einer Transfektion (als Mittelwert aus Doppelbestimmungen), die Säulen die Mittelwerte daraus.

### 3.3. Die Funktion von Tat in humanen Astrozyten

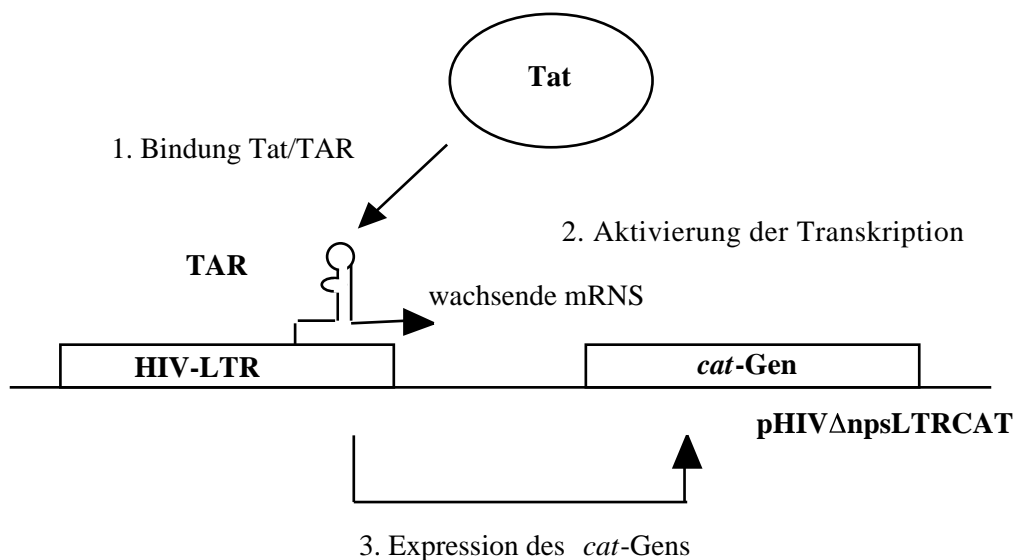
#### 3.3.1. Die Transaktivierung der HIV-LTR durch Tat

Tat hat eine wichtige Bedeutung als zweites essentielles HIV-kodiertes Regulatorprotein, das wie Rev auf RNS-Ebene agiert und in diesem Zusammenhang für viele Experimente als Positivkontrolle dienen kann. Darüber hinaus ist die uneingeschränkte Funktion dieses Transkriptionsaktivators in den hier verwendeten Zelllinien Voraussetzung für die Anwendung der in den späteren Kapiteln 3.4. und 3.6. der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente zum Bindungs- und Oligomerisierungsverhalten von Rev.

Die Funktion von Tat wurde in der Literatur auch für Astrozytomzelllinien bereits beschrieben, jedoch liegen die Angaben zur Stärke der Stimulation der Expression zwischen 3- und 150fach. Dabei können die Ergebnisse z. B. als Folge der angewandten experimentellen Methode (wie Transfektion oder Infektion) als auch in Abhängigkeit von den verwendeten Plasmiden oder Reporterassays variieren. So beschrieben beispielsweise Han et al. eine Aktivierung der LTR durch Tat in HeLa-Zellen um einen Faktor von 142, Gorry et al. fanden dagegen eine nur 3fache Aktivierung für die gleiche Zelllinie (Han, P. et al., 1991) (Gorry, P. R.

et al., 1999). Für die Astrozytomzelllinie U87 liegen Untersuchungen vor, die die Aktivierung mit 50 bis 90 oder aber 20 angeben (Taylor, J. P. et al., 1992) (Taylor, J. P. und Khalili, K., 1994). Es war daher notwendig, die Funktion von Tat in allen verwendeten Zelllinien mit dem in dieser Arbeit angewandten CaPO<sub>4</sub>-Transfektionssystem zu untersuchen.

Dazu wurden die vier Astrozytomzelllinien U87, U138, U373 und 85HG66 sowie die beiden Kontrollzelllinien HeLa und HEK293 transient mit dem Reporterplasmid pHIV npsLTRCAT in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Effektorplasmides pcTat transfiziert. Abbildung 16 zeigt eine schematische Darstellung des Testprinzips. PHIV npsLTRCAT enthält das *cat*-Gen unter der Kontrolle des LTR-Promotors, d. h. die Transkription des *cat*-Gens wird Tat-abhängig stimuliert. Das Plasmid trägt eine Deletion im *nef*-Gen, die von Ludvigsen et al. als nps (nef partial sequence) beschrieben wurde (Ludvigsen, A. et al., 1996). Die nps-Sequenz reguliert die Aktivität der HIV-LTR in HIV-infizierten Astrozyten herab.



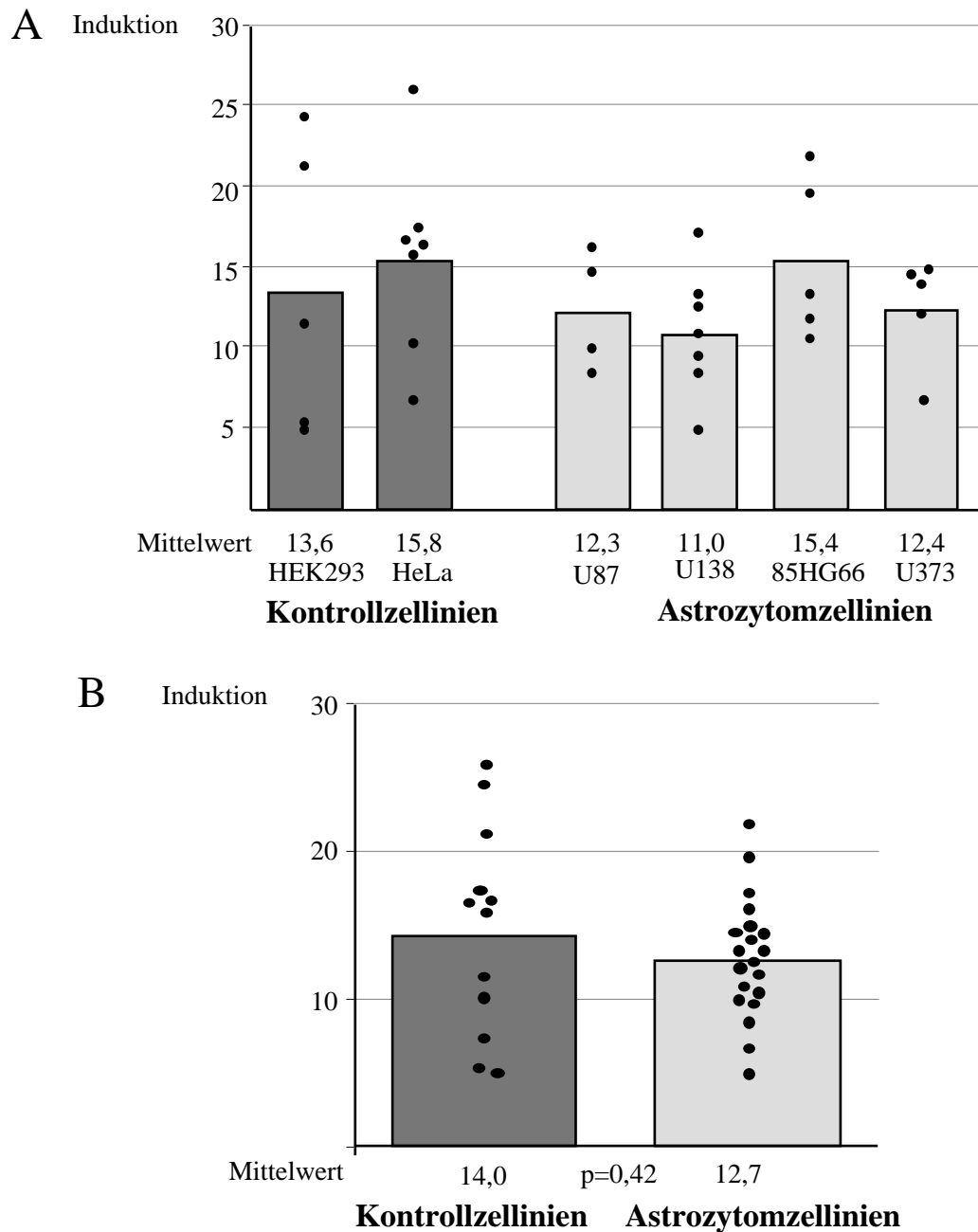
**Abb. 16:** Der experimentelle Ansatz zur Bestimmung der Tat-Aktivität in Zelllinien. Für nähere Angaben vgl. Text.

Zusätzlich wurde in jedem Ansatz das von dieser Regulation unabhängig exprimierte Luciferaseplasmid pGL3-RFB kotransfiziert. Alle Plasmide wurden in einer Konzentration von 1 µg pro Ansatz verwendet und die Transfektionen mindestens in Doppelansätzen ausgeführt. Die Induktionen als Maß für die Stimulation der LTR-Aktivität ergaben sich in diesen Experimenten aus dem CAT-Umsatz der Transfektion pHIV npsLTRCAT + pcTat dividiert durch die Basalaktivität aus der Transfektion pHIV npsLTRCAT ohne pcTat (zur Induktion vgl. Kap. 6.2.3.3.).

Es wurde darauf geachtet, Plasmide zu verwenden, die bezüglich der Promotoren und des Vektorhintergrundes möglichst denen entsprachen, die auch für die späteren Bindungsstudien (Kap. 3.4.) verwendet wurden. Dieses Vorgehen sicherte größtmögliche Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten. Darüber hinaus können aus der Tat-Transaktivierung Rückschlüsse auf die zu



erwartende Höhe der Aktivierung im verwendeten Bindungssystem gezogen werden (Kap. 3.4.4.). Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse.



**Abb. 17:** Transaktivierung der HIV-LTR durch den viralen Regulator Tat in Astrozytom- und Kontrollzelllinien. A zeigt die Ergebnisse für die einzelnen Zelllinien, B faßt alle Astrozytom- bzw. Kontrollzelllinien zusammen. Punkte kennzeichnen Einzelexperimente in Doppelansätzen, Säulen den entsprechenden Mittelwert.

Alle untersuchten Zelllinien unterstützten die Funktion von Tat (Abb. 17A); die Aktivität der LTR wurde um einen Faktor zwischen 11 und 15,8 gesteigert. Die CAT-Messungen wurden teilweise mit dem CAT-ELISA, teilweise im funktionellen CAT-Test durchgeführt (Kap. 6.2.3.3. und 6.2.3.4.); es konnte keine Abhängigkeit zwischen der verwendeten Methode und der Induktion festgestellt werden. So ergaben sich z. B. für die Zelllinie U87 mit dem ELISA

Induktionen von 8,4 und 14,6, mit dem funktionellen Test in unabhängigen Experimenten 10,0 und 16,1 (vgl. auch das Beispiel in Kap. 6.2.3.4.).

Nimmt man alle 12 Werte für die beiden Kontrollzelllinien und alle 21 Werte für die vier Astrozytomzelllinien zusammen (Abb. 17B), ergibt sich ein Mittelwert von 14,0 gegenüber 12,7. Die statistische Analyse der Daten erbrachte, daß beide Ergebnisgruppen einer Gauß'schen Normalverteilung entsprechen und sich nicht signifikant voneinander unterscheiden ( $p = 0,42$ ). Die Standardabweichung lag für die Astrozytomzelllinien bei 4,1 und für die Kontrollzelllinien bei 6,2.

Standardisiert man die Tat-Induktionen aus Abbildung 17B auf die jeweils zugehörigen Luciferase-Werte (vgl. Abb. 18, S. 43), liegt der Mittelwert für die Kontrollzelllinien bei 12 gegenüber 14 aus den unstandardisierten Werten und für die Astrozytomzelllinien bei 13,9 gegenüber 12,7. Diese Werte unterscheiden sich wiederum nicht signifikant voneinander oder von den unstandardisierten Werten, so daß als Standardisierungsmaß die relative Einheit der Induktion genügen soll.

Es kann festgehalten werden, daß die Funktion des viralen Regulators Tat in den vier getesteten Astrozytomzelllinien im Vergleich zu zwei Kontrollzelllinien, in denen eine produktive HIV-Replikation stattfindet, nicht eingeschränkt ist.

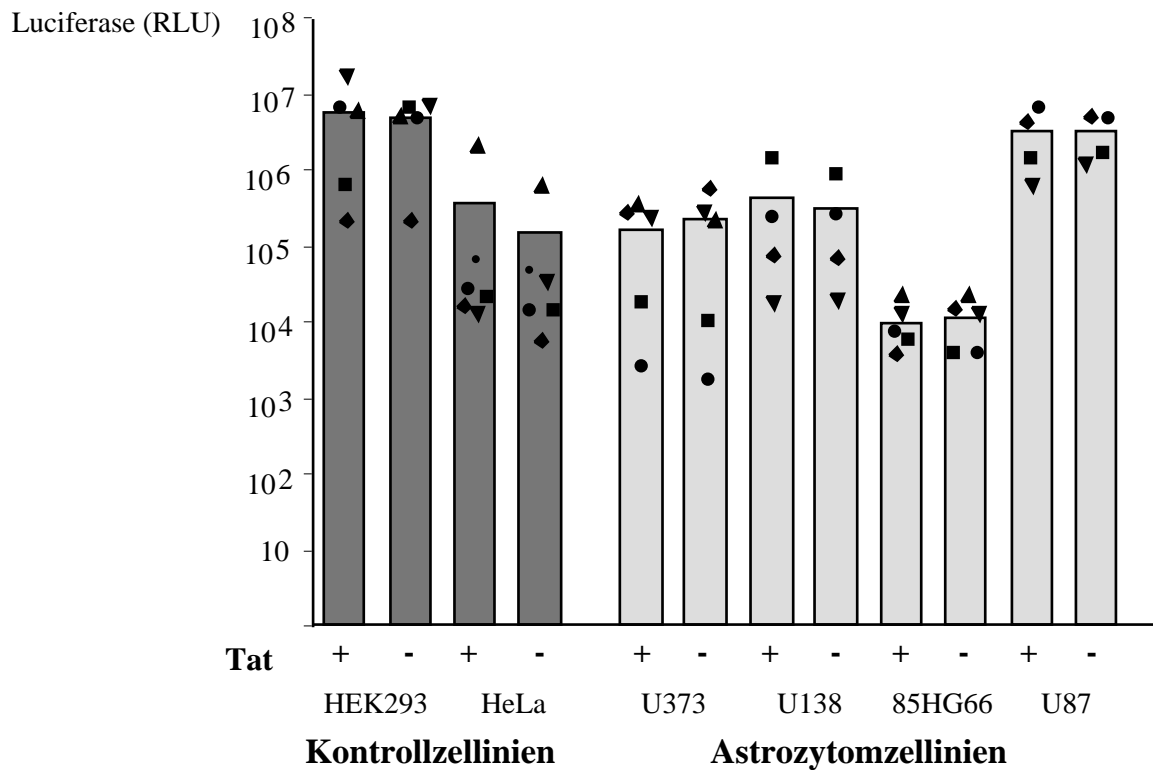
### **3.3.2. Der Einfluß von Tat auf einen unabhängigen Promotor**

Analog zu den Luciferase-Daten aus Kap. 3.2.4. zur Rev-Transaktivierung wurden auch zu jedem Experiment der Tat-Transaktivierung parallel die Luciferase-Werte ermittelt. Da Tat ein genereller Transkriptionsaktivator ist, der Transkriptionsfaktoren rekrutiert (Kap. 1.1.2.2.1.), gibt diese Kontrolle möglicherweise auch Hinweise auf einen Einfluß von Tat auf heterologe Promotoren.

Die Daten sind in Abbildung 18 zusammengefaßt. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Luciferase-Daten in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von Tat festzustellen. Alle Werte wurden auf 50 µg Gesamtprotein standardisiert.

Die Anwesenheit von Tat hat in den hier verwendeten Konzentrationen weder einen toxischen noch einen aktivierenden Einfluß auf die Expressionsaktivität der Zellen.

**Abb. 18 (folgende Seite):** Die Expression des Reportergens *luciferase* in verschiedenen Zelllinien. Die Werte wurden parallel zum CAT-Umsatz in den Experimenten zur Tat-Transaktivierung gemessen. Verglichen werden die Luciferase-Werte in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Tat für jede Zelllinie. Gleiche Symbole kennzeichnen Werte aus einer Transfektion (Mittelwert aus Doppelbestimmungen), die Säulen die Mittelwerte daraus.



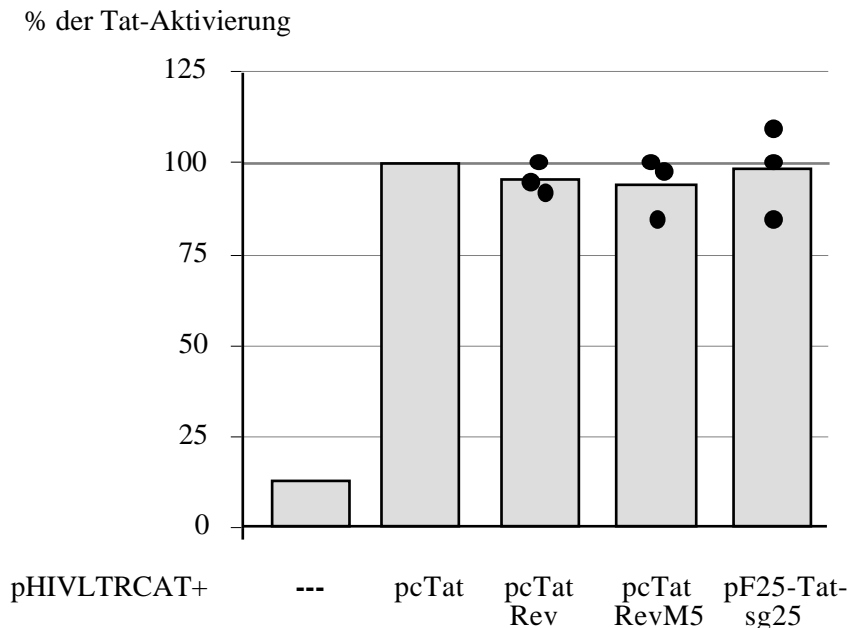
### 3.3.3. Die Funktion von Tat an der HIV-LTR im Kontext von Fusionsproteinen

Da im Rahmen dieser Arbeit Tat als Teil von Fusionskonstrukten verwendet wurde und das Ergebnis der Experimente abhängig von der Tat-Funktion war, wurden diese Fusionsproteine auf ihre Aktivität an der HIV-LTR untersucht. Dazu wurden HeLa-Kontrollzellen mit je 1 µg Reporterplasmid und 1 µg des zu testenden Effektorplasmids transfiziert. Reportergenkonstrukt war pHIVLTRCAT (Ludvigsen, A. et al., 1996). Da für die Prüfung der Tat-Aktivität HeLa-Kontrollzellen verwendet wurden, wurde nicht das modifizierte Plasmid pHIV npsLTRCAT transfiziert (Kap. 3.3.1.), sondern das parentale vollständige Konstrukt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde das Luciferase-Plasmid pGL3-RFB in jedem Ansatz kotransfiziert.

Als Effektorplasmide dienten pcTat, pcTatRev (vgl. Kap. 3.4.), pcTatRevM5 (vgl. Kap. 3.6.) und pF25-Tat-GFP (für eine Übersicht siehe Abb. 8, S. 27). Die Plasmide standen unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Der Vektorhintergrund ist mit Ausnahme von pF25-Tat-GFP identisch. pF25-Tat-GFP exprimiert ein Fusionprotein aus Tat und GFP. In Kapitel 3.1.1. wurde beschrieben, daß in ausgewählten Ansätzen das GFP-Expressionsplasmid pFred143 kotransfiziert wurde. Durch die Verwendung des Fusionsproteins Tat-GFP und einen Vergleich der Tat-Funktion zum unfusionierten Tat kann ein eventueller negativer Effekt durch die Anwesenheit von GFP in den Zellen überprüft werden. GFP ist mit 239 Aa der größte Fusionspartner von Tat.

In Abbildung 19 sind drei unabhängige Experimente, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden, zusammengefaßt. Keines der getesteten Fusionsproteine zeigte einen signifikanten Unterschied der Transaktivierungs-Kapazität gegenüber der Transaktivierung durch Tat ohne Fusionspartner, die gleich 100% gesetzt wurde. Die Standardabweichungen

liegen für die pcTatRev-Messungen bei 4,1, für pcTatRevM5 bei 8,6 und für pF25-Tat-GFP bei 12,8.



**Abb. 19:** Die Transaktivierung der HIV-LTR durch Tat im Kontext verschiedener Fusionskonstrukte. Von jedem Plasmid wurde 1 µg pro Ansatz verwendet. Die Aktivierung der HIV-LTR durch Tat ohne Fusionspartner wurde in jedem Experiment gleich 100% gesetzt. Punkte bezeichnen Einzelerperimente in Doppelbestimmungen, Säulen den Mittelwert.

### 3.4. Die Bindung von Rev an seine Ziel-RNS in humanen Astrozyten

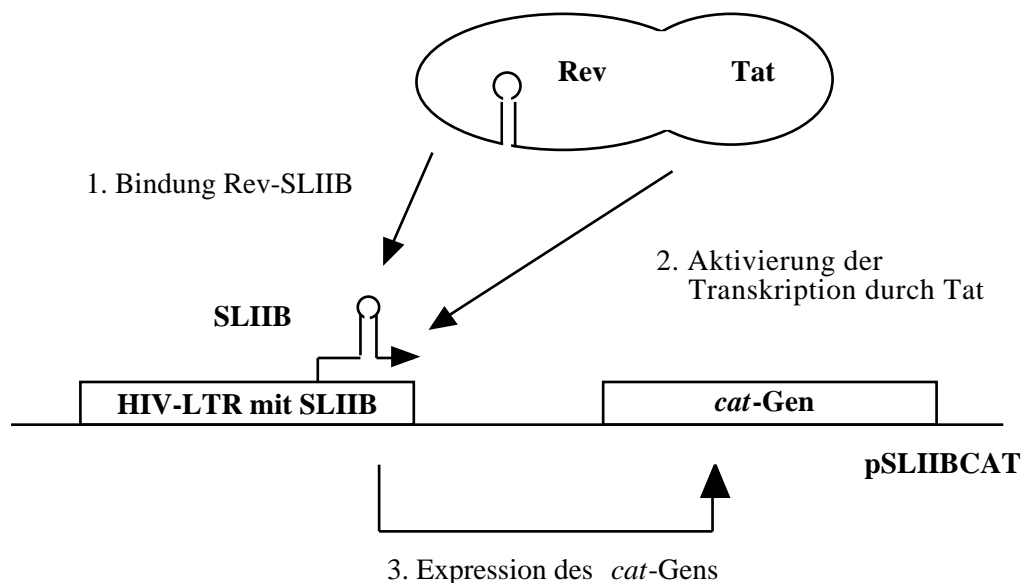
#### 3.4.1. Ein *in vivo* System zur Prüfung der Rev/RNS-Bindung in Zelllinien

Ziel dieser Untersuchungen war es, einzugrenzen welche(r) der einzelnen an der Rev-Regulation beteiligten Schritte (ein Überblick findet sich in Abb. 2, S. 5) im Kontext der Astrozyten beeinträchtigt sein könnte. Zunächst wurde die Bindungskapazität von Rev an seine Ziel-RNS SLIIB betrachtet. Ein Plasmidsystem auf der Basis transienter Transfektionen ermöglichte es, über die Expression des Reportergens *cat* die Rev/RNS-Bindung im jeweiligen Zelltyp zu ermitteln. Da die Bindung *in vivo*, also in den lebenden Zellen unter möglichst nativen Bedingungen, stattfand, ermöglichte dieses Verfahren, die RNS-Bindung von Rev unter Einfluß aller zellspezifischen Einflußfaktoren zu ermitteln. Darüber hinaus konnten so verschiedene Zelllinien miteinander verglichen werden.

Der experimentelle Ansatz zur *in vivo*-Untersuchung der Rev/SLIIB-Bindung ist in Abbildung 20 schematisch dargestellt. Im Reporterplasmid pSLIIBCAT wurde in der LTR die Bindesequenz für Tat, das TAR-Element, gegen die minimale Bindesequenz für Rev, SLIIB, ausgetauscht (Tiley, L. S. et al., 1992). Zur Struktur der RRE und der Lage des SLIIB vgl. Abbildung 5 (S. 11). Die Expression des Reportergens *cat* ist damit in diesem Konstrukt (im Gegensatz zu dem in Abb. 16 (S. 40) gezeigten Ansatz zur Tat-Transaktivierung) nicht mehr

durch die Bindung von Tat direkt aktivierbar. Kotransfiziert man dagegen ein Expressionsplasmid für ein TatRev-Fusionsprotein, so kann der Rev-Anteil dieses Proteins an SLIIB binden und damit auch der Tat-Anteil zum Promotor gelangen. Tat stimuliert dann am LTR-Promotor die Transkription des *cat*-Gens. Der Test ermöglichte es, selektiv das Bindungsvermögen von Rev an SLIIB zu betrachten (vgl. Kap. 4.2.1.).

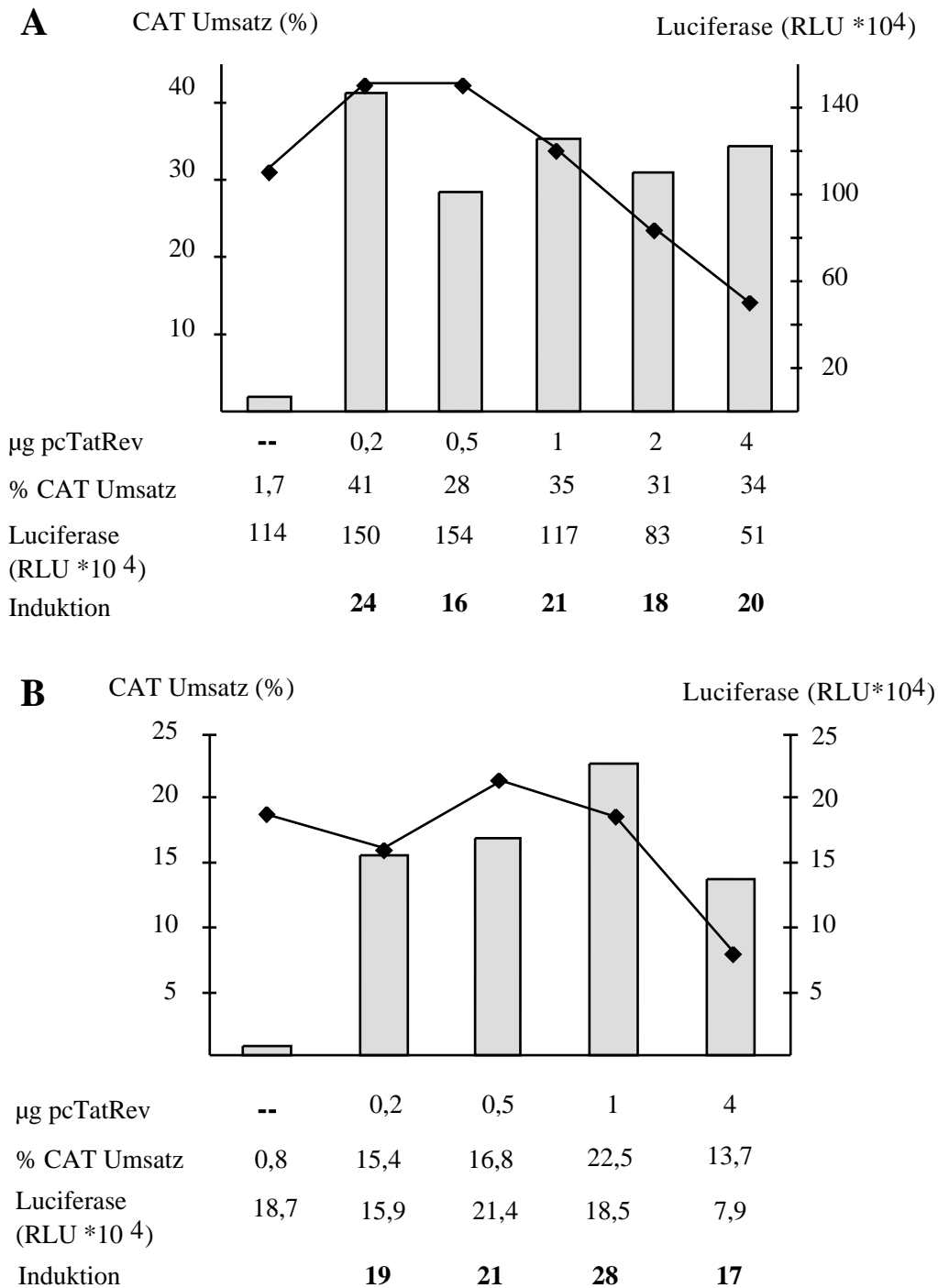
Das TatRev-Fusionsprotein besteht aus jeweils vollständigem HIV-1 Tat und Rev; die Funktionalität von Tat im Fusionsprotein wurde wie in Kap. 3.3.3. beschrieben bestätigt. Die Rev-Funktion in diesem Kontext wurde von Tiley et al. nachgewiesen (Tiley, L. S. et al., 1992). In Astrozyten führte die Fusion von Rev an Tat zu keiner Steigerung der Rev-Aktivität (Ludwig, E., 1999).



**Abb. 20:** Ein Schema des Tests zur Bindung Rev/SLIIB in Zelllinien. Die Bindungskapazität von Rev wurde über die Transaktivierung des Reportergens *cat* gemessen. Details sind im Text beschrieben.

### Optimierung der Transfektionsbedingungen

Analog zur Vorgehensweise bei den Experimenten zur Rev-Transaktivierung wurden auch für den Bindungstest die optimalen Plasmidkonzentrationen in einem Vorversuch ermittelt. Für pSLIIBCAT wurde aufgrund von Angaben in der Literatur eine Konzentration von 2 µg gewählt (Tiley, L. S. et al., 1992) (Hammerschmid, M. et al., 1994) (Thomas, S. L. et al., 1998) und in einer Titration analog zu der in Abbildung 9 (S. 30) dargestellten in HEK293-Zellen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die pcTatRev-Konzentration an SLIIB wurde in HeLa-Zellen titriert. Zwei der Experimente zur Titration sind in Abbildung 21 dargestellt. Die Einzelwerte sind der jeweils beigefügten Tabelle zu entnehmen.



**Abb. 21:** Zwei Titrationsexperimente zur Festlegung der Menge an pcTatRev für den Bindungstest. HeLa-Kontrollzellen wurden in Doppelansätzen transfiziert. Alle Ansätze enthielten 2 µg pSLIIBCAT, der Ansatz ohne pcTatRev enthielt 1 µg pcTat. Säulen stellen den CAT-Umsatz in Prozent dar, die Punkte die zugehörigen Luciferase-Werte.

Schon die Transfektion von 2 µg pSLIIBCAT mit 0,2 µg pcTatRev hatte eine Erhöhung der CAT-Expression um einen Faktor von 24 zur Folge (Abb. 21A). Allerdings sind die Luciferase-Werte für die Ansätze mit 0,2 bzw. 0,5 µg pcTatRev gegenüber dem Wert ohne pcTatRev erhöht. Es könnte sich um eine unspezifische Aktivierung der Transkription durch geringe Mengen Tat handeln, die jedoch nicht immer reproduzierbar war (vgl. auch die TatRev-Titration

an pHIV npsLTRCAT aus Kap. 3.4.5.). Im Ansatz mit pSLIIBCAT ohne Effektor war keine Erhöhung der Luciferase-Werte meßbar (Daten nicht gezeigt). Bei weiterer Erhöhung der pcTatRev-Konzentration auf 2 bzw. 4 µg war ein deutlicher Rückgang der Luciferase-Werte festzustellen. Die CAT-Expression fiel in den Werten zwischen 0,2 und 1 µg pcTatRev zunächst ab, stieg dann jedoch wieder an.

Um diese Schwankung zu verifizieren, wurde das Experiment mehrfach wiederholt (vgl. das Beispiel in Abb. 21B). Dabei stiegen die CAT-Werte bis zu einer Konzentration von 1 µg pcTatRev an, wobei die Luciferase-Werte nur eine Abweichung von 12% zum Wert ohne TatRev aufwiesen. Bei einer Konzentration von 4 µg pcTatRev nahmen dann beide Werte deutlich ab. Die Luciferase-Werte sanken in beiden Experimenten unter 50% des Wertes ohne TatRev (56% bzw. 58%). Diese Reduktion könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Zellen vermehrt Transkriptionsfaktoren zur Synthese von TatRev verwenden, da dieses Plasmid in einer großen Menge vorhanden ist, und die Synthese anderer Proteine vernachlässigen.

Aufgrund dieser Daten wurde die Menge an pcTatRev für die Transfektionen zur Untersuchung der Rev/RNS-Bindung auf 1 µg festgelegt. Die Luciferase-Expression ist in diesem Fall konstant zum Wert ohne pcTatRev, die CAT-Expression nicht im Sättigungsbereich. Entsprechende Titrations wurden auch in HEK293- und U138-Zellen durchgeführt und bestätigten die dargestellten Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

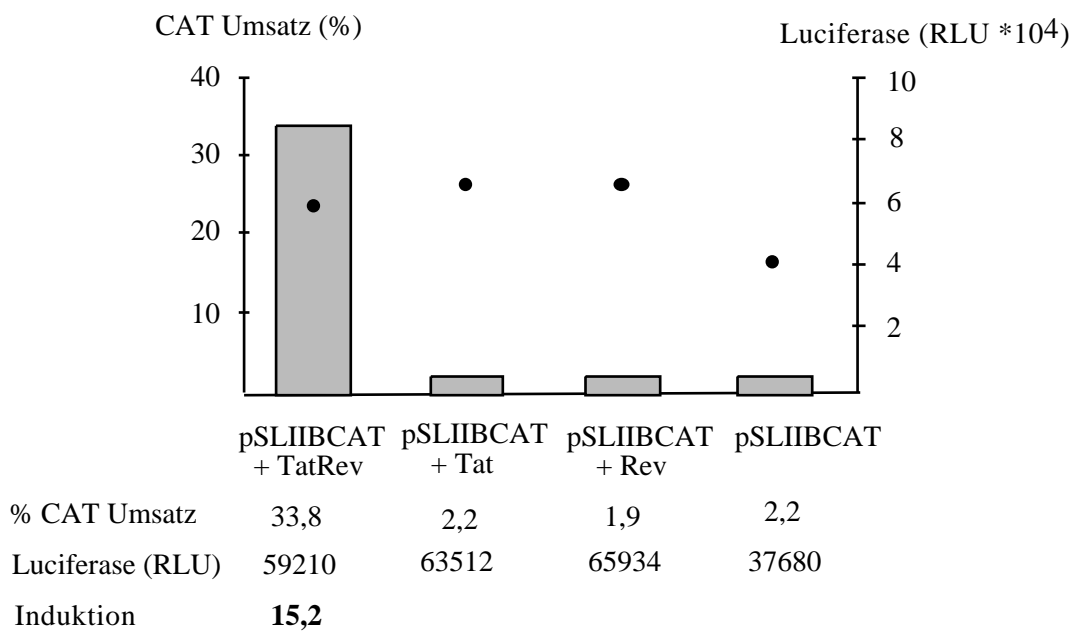
### **3.4.2. Rev bindet in humanen Astrozyten an seine Ziel-RNS SLIIB**

Die Fähigkeit von Rev, an seine Ziel-RNS zu binden, wurde zunächst in drei Astrozytomzelllinien im Vergleich zu zwei Kontrollzelllinien untersucht. Die Induktion, d. h. in diesem Falle die Steigerung der Aktivität der modifizierten LTR in Gegenwart von TatRev, berechnet sich aus der Division des CAT-Umsatzes im Ansatz pSLIIBCAT plus pcTatRev und des CAT-Umsatzes im Ansatz pSLIIBCAT plus pcTat. Letzterer spiegelt die Basalaktivität des Reporterplasmides in den jeweiligen Zelllinien wider (vgl. Kap. 6.2.3.3.). Der Vergleich zum Ansatz mit Tat schließt aus, daß eine TAR-unabhängige Aktivierung der LTR durch Tat in die Berechnung für die Bindekapazität von Rev mit eingeht. Eine TAR-unabhängige Aktivierung wurde insbesondere für Astrozytomzelllinien mehrfach beschrieben (vgl. Kap. 1.1.2.2.1. und die dortigen Literaturangaben). Der experimentelle Ansatz und die verwendeten Kontrollen sind am Beispiel von U373-Astrozytomzellen und HeLa-Kontrollzellen in Abbildung 22 erläutert.

**Abb. 22 (folgende Seite):** A beschreibt eine Transfektion von HeLa-Kontrollzellen zur Untersuchung der Bindungskapazität von Rev an seine Ziel-RNS. B zeigt ein entsprechendes Experiment für die Astrozytomzelllinie U373. Säulen geben die Substrat-Umsatzrate durch das CAT-Enzym wieder, Punkte kennzeichnen die Werte aus der parallelen Luciferase-Messung. Die genauen Einzelwerte sind in den Tabellen vermerkt. Angegeben sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

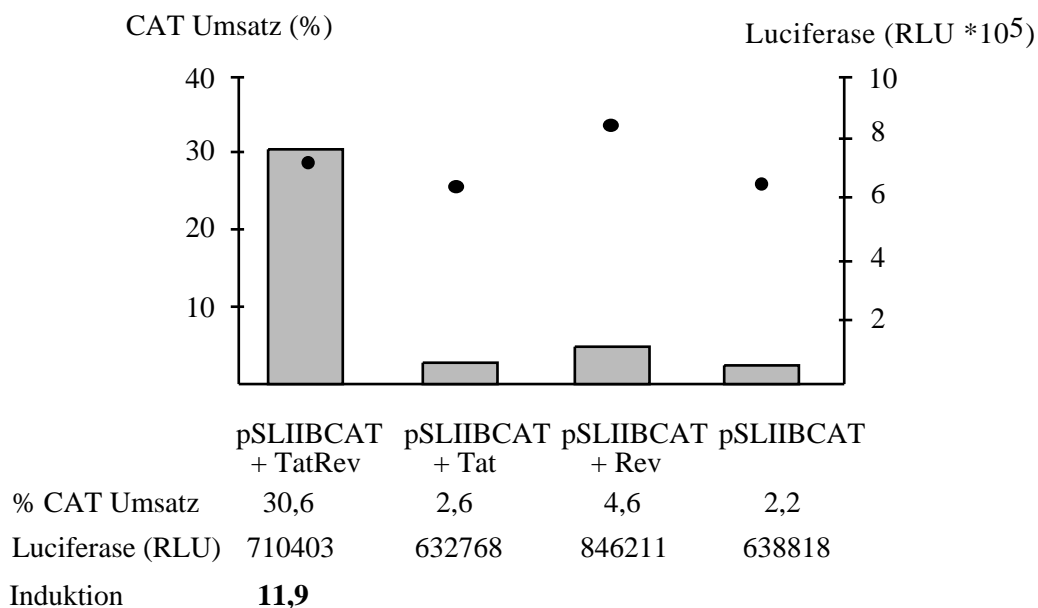
**A**

**HeLa-Kontrollzellen**



**B**

**U373-Astrozytomzellen**



Tat und Rev alleine hatten keine Aktivierung der CAT-Expression von pSLIIBCAT zur Folge, das TatRev-Fusionsprotein induzierte dagegen die CAT-Expression in HeLa-Zellen um einen Faktor von 15,2 (= 33,79/2,23), in U373-Zellen um einen Faktor von 11,9 (= 30,63/2,57).

Als unabhängiges Reporter gen wurde wieder pGL3-RFB kotransfiziert. Wichen die Werte aus der Luciferase-Messung innerhalb einer Transfektion für eine Zelllinie um mehr als 50% voneinander ab, wurde das Experiment nicht gewertet. Derselbe Grenzwert galt für die Schwankung der CAT-Werte in den Doppelbestimmungen. In ausgewählten Transfektionen wurde der Kontrollansatz pSLIIBCAT + pcTat + pcRev durchgeführt. Diese Effektoren führten in keiner der verwendeten Zelllinien zu einer Aktivierung der CAT-Expression (Daten nicht gezeigt).

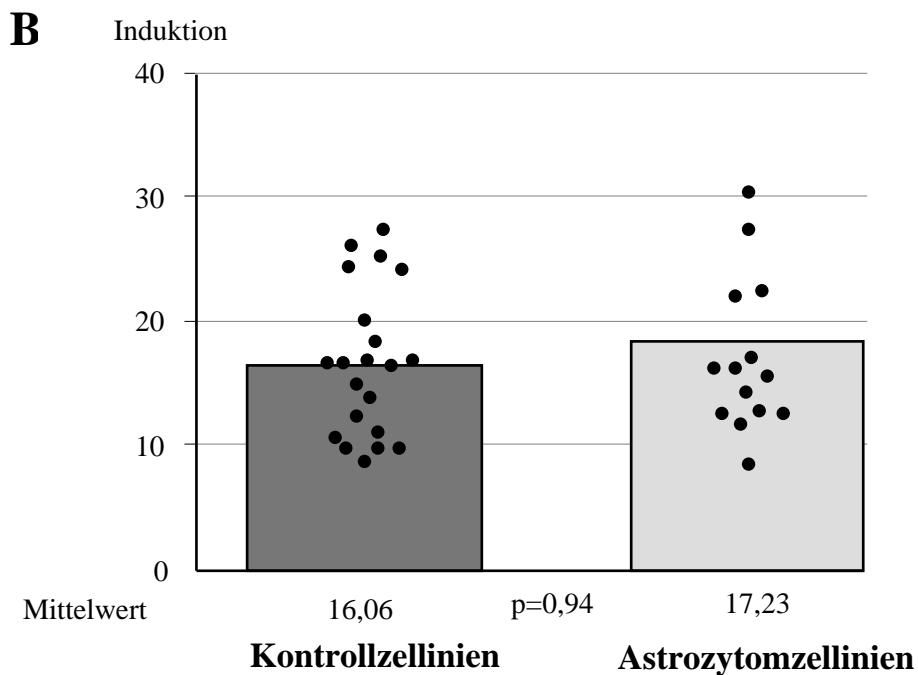
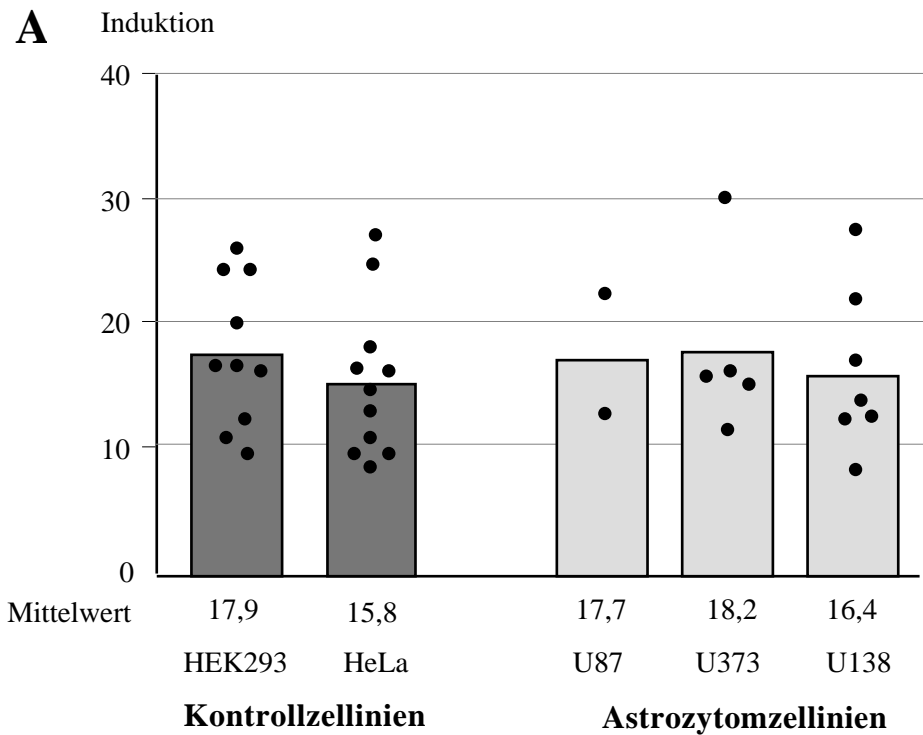


In beiden Zelllinien ist Rev also in der Lage, selektiv an seine Ziel-RNS SLIIB zu binden. Die Luciferasewerte sind innerhalb des vorgegebenen 50%-Rahmens konstant, weshalb auf eine Standardisierung der CAT-Werte auf die Luciferase verzichtet wurde. Die Verwendung der relativen Einheit der Induktion sicherte die Vergleichbarkeit der Zelllinien untereinander.

Abbildung 23 faßt die Ergebnisse in den verschiedenen Zelllinien zusammen. Die Untersuchungen wurden in drei Astrozytomzelllinien (U87, U373 und U138, insgesamt 14 Werte) im Vergleich zu zwei Kontrollzelllinien (HeLa und HEK293, insgesamt 21 Werte) durchgeführt (vgl. Abb. 23A). Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied; TatRev ist in allen Zelllinien in der Lage, die CAT-Expression in Folge der Rev-Bindung an SLIIB signifikant zu erhöhen. Die Mittelwerte der Induktionen für die einzelnen Zelllinien liegen 15,8 und 18,2.

Nimmt man alle Werte aus den Kontrollzellen gegenüber den Werten aus den Astrozytomzelllinien zusammen (Abb. 23B), ergibt sich ein Mittelwert von 16,8 gegenüber 17,2. Die Werte entsprechen einer Gauß'schen Normalverteilung, der p-Wert für die beiden Ergebnisgruppen beträgt 0,94. Die Standardabweichung liegt bei den Astrozytomzelllinien bei 6,4 gegenüber 6,0 für die Kontrollzelllinien. Astrozytom- und Kontrollzellen unterscheiden sich nicht im Bindungsverhalten von Rev an SLIIB.

**Abb. 23 (folgende Seite):** Die Bindung von Rev an seine Ziel-RNS SLIIB in Astrozytom- bzw. Kontrollzelllinien. Die Bindungskapazität von Rev ist als Induktion der CAT-Expression dargestellt. A zeigt die Ergebnisse in den einzelnen Zelllinien, B faßt alle Astrozytom- bzw. Kontrollzelllinien zusammen. Punkte bezeichnen Einzelexperimente in Doppelansätzen, Säulen den entsprechenden Mittelwert.



### 3.4.3. Die Lokalisation von Rev und TatRev in humanen Astrozyten

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß die verminderte Rev-Funktion mit einer Veränderung der Rev-Lokalisation in humanen Astrozyten einhergeht (Ludwig, E. et al., 1999). Rev lokalisiert zu großen Teilen im Zytoplasma der Astrozyten, in Kontrollzellen dagegen nukleär/nukleolär. Tat ist demgegenüber in Astrozyten wie in Kontrollzellen im Zellkern zu finden (Ludwig, E. et al., 1999).

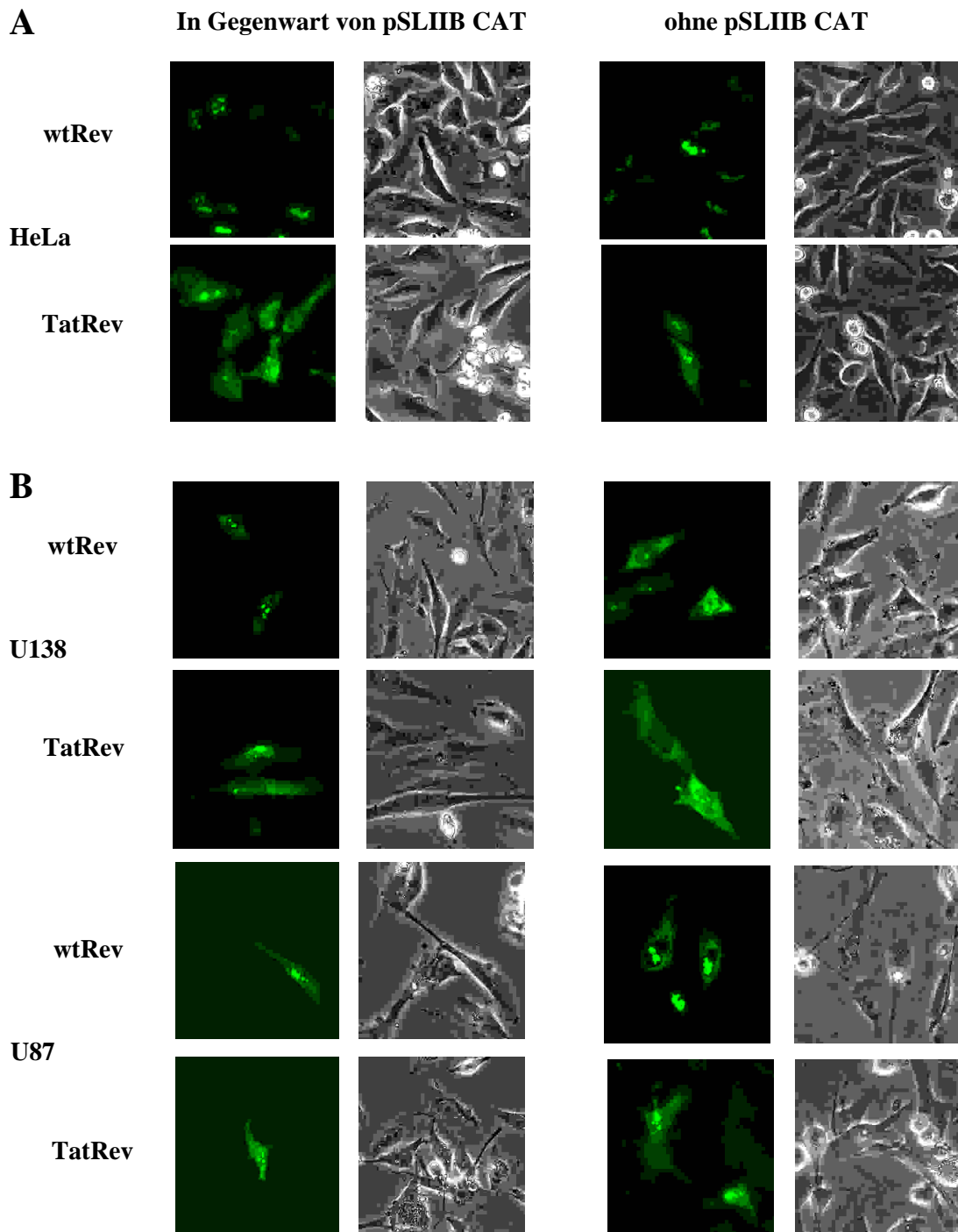
Es wäre denkbar, daß das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) von Tat stärker ist als das von Rev und daher im TatRev-Fusionsprotein zu einer nukleären Lokalisation desselben in Astrozyten führt. Denkbar ist auch eine Akkumulation von TatRev im Zellkern durch die Bindung an das Reporterplasmid. Eine solche, durch den Tat-Teil des Fusionsproteins verursachte, für Astrozyten jedoch nicht typische Rev-Lokalisation könnte die Ergebnisse des Bindungstests beeinflussen. Daher wurde die Lokalisation von Rev und TatRev mit Hilfe von Fusionen dieser Proteine an GFP jeweils in Gegenwart und in Abwesenheit von pSLIIBCAT in lebenden Zellen ermittelt. Wie in Abbildung 7 (S. 24) gezeigt wurde, ist GFP ohne Fusionspartner gleichmäßig in den Zellen verteilt (vgl. auch (Cubitt, A. B. et al., 1995)). Abbildung 24 zeigt die Lokalisation von Rev und TatRev in HeLa-Kontrollzellen und zwei Astrozytomzelllinien.

Die Lokalisation von Rev ist, wie bereits beschrieben, in der Kontrollzelllinie hauptsächlich nukleär/nukleolär und in der Astrozytomzelllinie nukleär/nukleolär sowie zytoplasmatisch. Sie ist in der Abbildung zum Vergleich angegeben. TatRev lokalisiert in allen Zelllinien sowohl im Zellkern (insbesondere in den Nukleoli) als auch im Zytoplasma. Die Fusion an Tat verändert die Lokalisation von Rev in Astrozyten demnach nicht. Die Anwesenheit des Reporterplasmids und damit ein Stattfinden der Bindung hat auf die Lokalisation ebenfalls keinen Einfluß und führt nicht zu einer Akkumulation von TatRev im Nukleus.

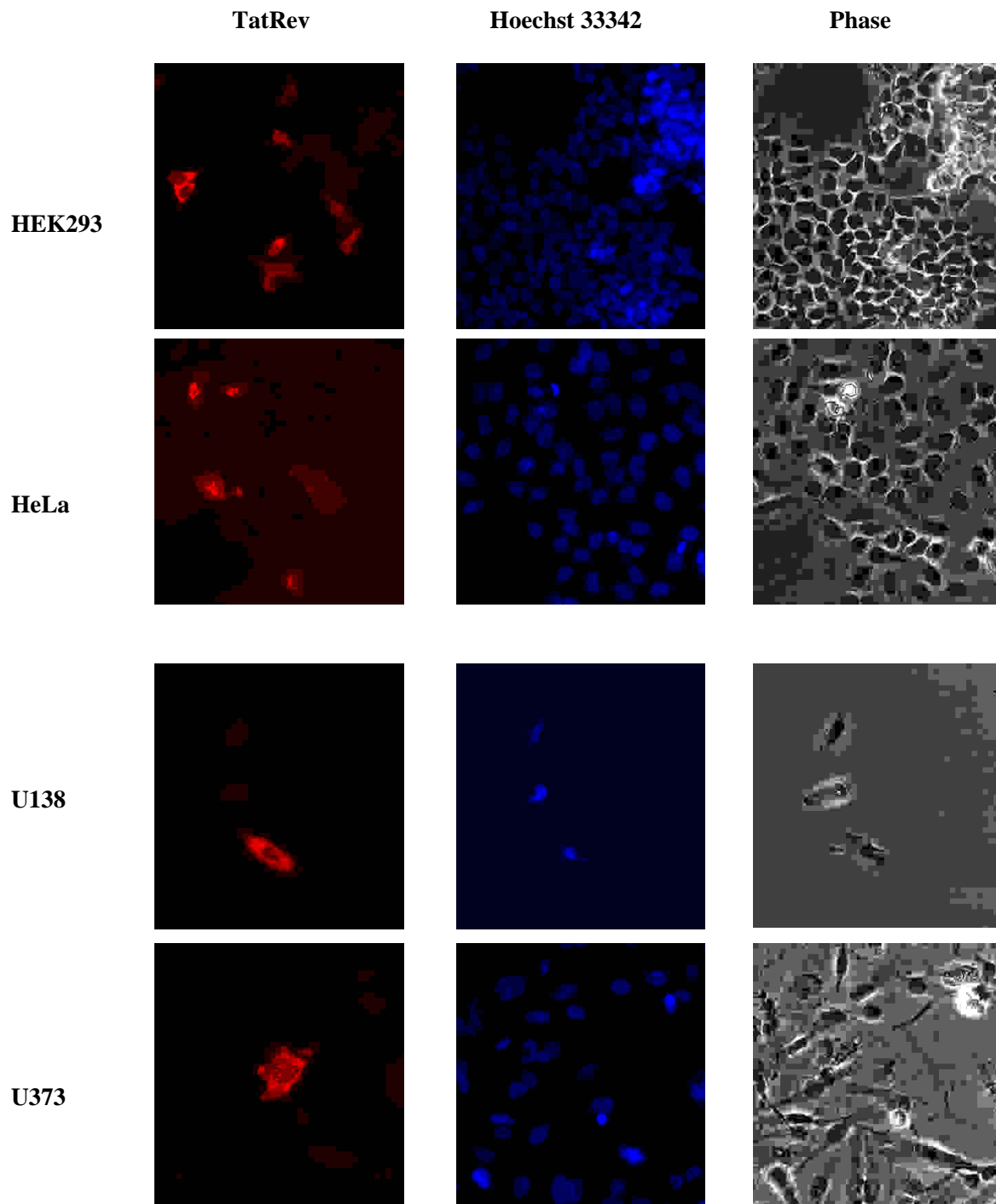
Die Fusion zweier kernlokalisierter Proteine bewirkte in den Kontrollzellen eine verstärkte Lokalisation dieses Fusionsproteins im Zytoplasma der Zellen. Diese veränderte Lokalisation könnte mit der Größe des Fusionsproteins in Zusammenhang stehen. Da für den gezeigten Nachweis TatRev darüberhinaus noch an GFP fusioniert wurde, wäre durch eine Faltung dieses großen Proteins beispielsweise die Maskierung eines Importsignals denkbar.

Um zu prüfen, ob die Lokalisation von TatRev mit einem Einfluß der Größe des Proteins durch die Fusion an GFP in Zusammenhang gebracht werden kann, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz an fixierten Zellen durchgeführt. Die Lokalisation von TatRev wurde mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen anti Rev Antikörpers geprüft (Abb. 25) TatRev befindet sich auch in diesem Ansatz hauptsächlich im Zytoplasma und in den Nukleoli der Zellen. Diese Lokalisation ist vermutlich auf eine Konkurrenz der Import- und Exportsignale aus Tat und Rev zurückzuführen. Stauber et al. konnten zeigen, daß eine Tat-Mutante, die das Rev-Exportsignal enthält, ebenfalls im Zytoplasma von HeLa-Zellen lokalisiert (Stauber, R. H. und Pavlakis, G. N., 1998).

Es kann festgehalten werden, daß die Lokalisation des TatRev-Proteins in Astrozyten der Lokalisation in Kontrollzellen entspricht und unabhängig von der Anwesenheit des Reporterplasmids ist. Ein Einfluß auf die Ergebnisse des Bindungstests resultierend durch einen Tat-bedingten Unterschied in der Lokalisation kann somit ausgeschlossen werden.



**Abb. 24:** Die Abbildung zeigt die Lokalisation von Rev und TatRev in HeLa-Zellen (A) und U138 bzw. U87-Astrozytomzelllinien (B) mit und ohne Reporterplasmid pSLIIBCAT. Die Lokalisationen wurden auch für die anderen Zelllinien, die im Bindungstest verwendet wurden, ermittelt. Sie unterschieden sich nicht von den hier gezeigten. Die Transfektionen wurden mit dem FuGENE 6-Transfektionsreagenz durchgeführt (Kap. 6.2.1.4.2.).



**Abb. 25:** Die Abbildung zeigt die Lokalisation von TatRev in den für die Bindungsstudien verwendeten Zelllinien in der indirekten Immunfluoreszenz. Die Transfektionen wurden mit dem FuGENE 6-Transfektionsreagenz durchgeführt (Kap. 6.2.1.4.2.).

#### **3.4.4. Ein Vergleich zur Quantifizierung des Bindungsverhaltens von Rev**

Die beiden Systeme transienter Transfektionen zur Bestimmung der Tat-Transaktivierung (Kap. 3.3.) und der Bestimmung des Bindungsvermögens von Rev (Kap. 3.4.) in Zelllinien besitzen grundlegend den gleichen Aufbau. Die Messung der Rev-Bindung ist von der Tat-Transaktivierung abhängig. Die Expressionsplasmide für TatRev und Tat besitzen den gleichen Vektorhintergrund, also auch einen identischen Promotor. Kotransfiziert man die gleiche Menge pcTatRev oder pcTat mit pHIVLTRCAT, aktivieren beide Proteine die CAT-Expression nahezu im gleichen Maße (Kap. 3.3.3., Abb. 19, S. 44). Vergleicht man die CAT-Expression aus den beiden verschiedenen Ansätzen, so ist ein möglicher Unterschied wesentlich durch die Modifikation der LTR im Bindungssystem von TAR zu SLIIB und damit durch die Bindungsstärke von Rev/SLIIB relativ zu Tat/TAR zu begründen. Dabei sind allerdings nur Rohdaten aus einer Transfektion und CAT-Messung direkt vergleichbar. Die Induktionen können in der Regel nicht in dieser Weise verglichen werden, da in den meisten Fällen die Proteinlysate beider Ansätze unterschiedlich verdünnt werden mußten.

Das Plasmidsystem zur Messung der Tat-Transaktivierung repräsentiert das direkt HIV-abgeleitete System. Die Transaktivierung der HIV-LTR durch Tat ist stärker als die Transaktivierung der modifizierten SLIIB-LTR zur Untersuchung der Bindung (Tab. 3). Setzt man den CAT-Umsatz aus der Tat-Transaktivierung gleich 100 und berechnet den CAT-Umsatz aus dem Bindungstest als Prozent davon, so sollte der Prozentsatz bei vergleichbarem Bindungsverhalten von Rev in verschiedenen Zelllinien auch etwa gleich sein. Bei dieser Betrachtungsweise ist die Rev-Bindung die Variable und die Tat-Bindung die Konstante. Der Vergleich bietet somit unter den aufgezeigten Voraussetzungen einen Ansatz, die Bindungsstärke von Rev zwischen verschiedenen Zelllinien zu vergleichen.

Tabelle 3 zeigt diese Berechnung für die Experimente aus Abbildung 23, in denen beide Plasmidsysteme parallel transfiziert und die CAT-Werte anhand derselben Proteinverdünnung bestimmt wurden.

Kontrollzelllinie	A) pHIV nps-LTRCAT+pcTat	B) pSLIIBCAT+pcTatRev	Prozent B von A	Mittelwert Zelllinie (%)	Mittelwert Kontrollen
HEK293	44,2	20,1	45	65	
	47,7	34,4	72		
	1,135	1,03	91		
	6,142	3,335	54		
	42,34	23,88	56		
HeLa	50,2	14,2	28	66	<b>66%</b>
	68,5	62	90		
	65,8	33,7	51		
	54	35,1	65		
	23,4	22,5	96		
Astrozytom-zelllinie	A) pHIV nps-LTRCAT+pcTat	B) pSLIIBCAT+pcTatRev	Prozent B von A	Mittelwert Zelllinie (%)	Mittelwert Astrozyten
U138	34,6	22,5	65	59	
	47,4	25,3	53		
U87	2,24	1,325	59	95	
	1,163	1,535	131		
U373	62	30,6	50	40	<b>64 %</b>
	53,5	16,9	31		

**Tab. 3:** Die Tabelle gibt die CAT-Expression in Transfektionen zur Tat-Transaktivierung (pHIV npsLTRCAT+pcTat) und die CAT-Expression von Transfektionen zur Bindungskapazität von Rev (pSLIIBCAT+pcTatRev) im Vergleich an. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelansätzen jeweils einer Transfektion und wurden an der gleichen Menge Gesamtprotein bestimmt. Die Werte für U87-Zellen sowie die ersten vier Experimente für HEK293-Zellen wurden mit dem CAT-ELISA ausgewertet (Angabe in pg CAT pro 50 µg Gesamtprotein), die übrigen im funktionellen Test (Angabe in Prozent CAT-Umsatz).

Direkte Aussagen über die Bindungsstärke von Rev an SLIIB können in einem Vergleich verschiedener Zelllinien in diesem System nicht gemacht werden. Wendet man den Test z. B. zum Vergleich verschiedener Mutanten in derselben Zelllinie an, kann man die CAT-Expressionen direkt vergleichen und eine Bindungsstärke quantifizieren wie von Thomas et al. beschrieben (Thomas, S. L. et al., 1998). Mit verschiedenen Zelllinien ist dies nicht möglich, da die Zellen mit unterschiedlicher Effizienz transfiziert werden und exprimieren. Setzt man jedoch die CAT-Expressionen aus den zwei Plasmidsystemen wie beschrieben innerhalb der jeweiligen Zelllinie in Relation, so ergibt sich ähnlich der Induktion ein relativer Wert, der sich zum Vergleich der Zelllinien untereinander eignet. Es ist zu beachten, daß für jede Astrozytomzelllinie nur zwei Experimente in dieser Weise ausgewertet werden konnten (Tab. 3). Da die Bindung bzw. Transaktivierung in lebenden Zellen stattfindet und deshalb das System einer natürlichen Schwankung unterliegt - beeinflusst beispielsweise vom Stoffwechsel oder Aktivierungszustand der Zellen - ist die Wertemenge sicher zu klein für einen detaillierten Vergleich. Auffällig ist jedoch, daß die CAT-Expression im Bindungstest in Kontrollzellen (11 Werte) durchschnittlich

66% der CAT-Expression der Tat-Transaktivierung beträgt und in Astrozytomzelllinien (6 Werte) 64%. Diese Homologie kann neben den Induktionen aus Kap. 3.4.2. als weiterer Hinweis für eine vergleichbare Bindungskapazität von Rev in Astrozyten gegenüber den Kontrollzelllinien gewertet werden.

### 3.4.5. Der Bindungstest in der Astrozytomzelllinie 85HG66: ein Sonderfall?

Der Bindungstest wurde auch für die Astrozytomzelllinie 85HG66 durchgeführt, der parentalen Zelllinie der persistent infizierten Astrozytomzelllinie TH4-7-5 ((Brack-Werner, R. et al., 1992), Kap. 1.3.3.). Unter Verwendung dieser Zelllinie wurden wertvolle Erkenntnisse über die HIV-Infektion von Astrozyten gewonnen. Neumann et al. konnten zeigen, daß die verminderte HIV-Replikation dieser Zelllinie auf eine inhibierte Rev-Funktion zurückzuführen ist (Neumann, M. et al., 1995). Obwohl in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls gezeigt wurde, daß die verminderte Rev-Funktion ein allgemeines Merkmal von Astrozyten ist (Ludwig, E. et al., 1999), besitzen doch 85HG66-Zellen besondere Bedeutung.

Exp. Nr.	Reporter	pSLIIBCAT	pSLIIBCAT +TatRev	pHIV nps LTRCAT	pHIV nps LTRCAT/Tat	Passage 85HG66	Anmerkung
<b>1</b>	<b>CAT</b>	1,27	<b>1,9</b>	3,1	<b>36,9</b>	P+14	CaPO <sub>4</sub>
	Luciferase	4329	3445	4116	6377		
<b>2</b>	<b>CAT</b>	0,3	<b>0,8</b>	1,3	<b>13,4</b>	P+21	CaPO <sub>4</sub>
	Luciferase	3181	5248	15694	4293		
<b>3</b>	<b>CAT</b>	0,9	<b>1,2</b>	1,8	<b>26,3</b>	P+19	FuGENE™6 HeLa, U373
	Luciferase	10341	7100	2308	3808		
<b>4</b>	<b>CAT</b>	0,6	<b>2,5</b>	1,7	<b>33,2</b>	P+23	FuGENE™6 U373
	Luciferase	16086	14160	14046	13719		
<b>5</b>	<b>CAT</b>	0,4	<b>10,2</b>	2,4	<b>44,2</b>	P6+16	CaPO <sub>4</sub>
	Luciferase	9335	6023	19304	6789		
<b>6</b>	<b>CAT</b>	0,8	<b>9,0</b>	5,6	<b>65,3</b>	P6+18	CaPO <sub>4</sub>
	Luciferase	13265	23629	25785	50286		
<b>4 (U373)</b>	<b>CAT</b>	<i>1</i>	<b>16,1</b>	3,6	<b>53,4</b>		
	Luciferase	<i>531282</i>	<i>491847</i>	<i>238845</i>	<i>365908</i>		

**Tab. 4:** Die Ergebnisse aus sechs unabhängigen Experimenten zur Bindung von Rev an SLIIB in der Astrozytomzelllinie 85HG66. Unter „CAT“ ist die Umsatzrate des Substrates in Prozent angegeben. Die Luciferase-Werte entsprechen RLU pro 50 µg Gesamtprotein. In Experiment 2 und 5 ist die Abweichung der Luciferase-Werte in den Ansätzen mit pHIV npsLTRCAT größer als 50%. Die Experimente gingen in keine weiteren Berechnungen ein, sind jedoch zur Demonstration der CAT-Werte in diesem Zusammenhang mit angeführt. Die Spalte „Anmerkung“ gibt die Transfektionsmethode (FuGENE™6 oder CaPO<sub>4</sub>) an sowie ob parallel auch andere Zelllinien transfiziert wurden. Aus Exp. 4 ist ein Beispiel von U373-Zellen einer parallelen Transfektion mit demselben Plasmidmix angegeben (unten). Die aktivierten CAT-Umsatzraten sind hervorgehoben.



Die Tabelle 4 zeigt eine Zusammenstellung von sechs unabhängigen Bindungs-Experimenten in 85HG66-Astrozytomzellen, wobei eine CAT-Expression in nur zwei Fällen messbar war. Die parallel durchgeführte Transfektion von pHIV npsLTRCAT mit und ohne pcTat war in jedem Falle positiv. Die Induktionen der Tat-Transaktivierung in 85HG66 unterschieden sich nicht signifikant von den Induktionen aus Kap. 3.3.1. (Abb. 17, S. 41). Sie betragen 12, 14,6, 19,5 und 11,7 (dabei wurden die Experimente 2 und 5 aufgrund der Luciferase-Abweichung nicht mitgerechnet, vgl. auch Legende zu Tab. 4). Der in Kapitel 3.3.1. ermittelte Durchschnittswert lag bei 15,4 (Abb. 17, S. 41).

Um reproduzierbare Daten zur Bindungskapazität von Rev in 85HG66-Zellen zu erhalten, wurden wie in Tabelle 4 aufgelistet wesentliche Parameter der Transfektionen getestet und verändert.

Experiment 1 und 2 wurden mit der CaPO<sub>4</sub>-Methode durchgeführt wie alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen Transfektionen für Reporterstudien. Darüber hinaus wurden in Experiment 2 neue Plasmidpräparationen für pcTatRev und pSLIIBCAT verwendet. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß eines der beiden Plasmide nicht mehr exprimiert wurde und daher in Experiment 1 keine Aktivierung messbar war. Als Positivkontrolle für die Transfektionseffizienz sind die Luciferase-Werte für die einzelnen Ansätze in Tabelle 4 mit aufgeführt. Allerdings konnte auch in Experiment 2 keine Aktivierung der CAT-Expression durch die Bindung von Rev an SLIIB gemessen werden.

85HG66 ist unter den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien diejenige mit der geringsten Transfektionseffizienz (vgl. Abb. 15, S. 39, und Abb. 18, S. 43). Um die Effizienz zu erhöhen, wurden zwei weitere Experimente unter Verwendung des FuGENE™6-Transfektionsreagenz durchgeführt. FuGENE™6 erlaubt eine höhere Transfektionseffizienz, kann jedoch ungeeignet sein um eine größere Menge Gesamtplasmid in die Zellen zu bringen. Daher wurden in diesen Experimenten die Plasmidmengen des Standardansatzes halbiert. Darüber hinaus wurde kein pBSPL als Leerplasmid verwendet (vgl. Kap. 6.2.1.4.2.). Um sicherzugehen, daß die Transfektionsmethode nicht doch die Ergebnisse beeinflußt, wurden jeweils ein bzw. zwei andere Zelllinien parallel transfiziert und die Ergebnisse mit denen der CAPO<sub>4</sub>-Transfektionen aus Kap. 3.4.2. verglichen.

Wiederum konnte keine Bindung Rev/SLIIB in 85HG66-Zellen festgestellt werden. Dagegen war die Transaktivierung in den parallel transfizierten Zelllinien deutlich. Die Tabelle 4 gibt in Experiment 4 ein Beispiel der Astrozytomzelllinie U373, in der die Kotransfektion von pSLIIBCAT mit pcTatRev zu einer 16fachen Erhöhung der CAT-Expression führte. Der Durchschnitt für diese Zelllinie lag bei 18,2 (vgl. Abb. 23, S. 50). Derselbe Transfektionsmix führte in 85HG66 nicht zu einer signifikanten Erhöhung der CAT-Expression. Die Tat-Transaktivierung war dagegen wieder in jedem Fall messbar und unterschied sich nicht signifikant von den in Abbildung 17 (S. 41) gezeigten Daten.

In einem weiteren Experiment unter Verwendung der CaPO<sub>4</sub>-Methode, neu präpariertem pSLIIBCAT-Plasmid und neu aufgetauten 85HG66-Zellen einer anderen Passagenzahl konnte jedoch eine Transaktivierung des CAT-Umsatzes von 0,4% im uninduzierten Ansatz auf 10,2% im Ansatz mit TatRev nachgewiesen werden (Experiment 5 der Tabelle). Allerdings war der

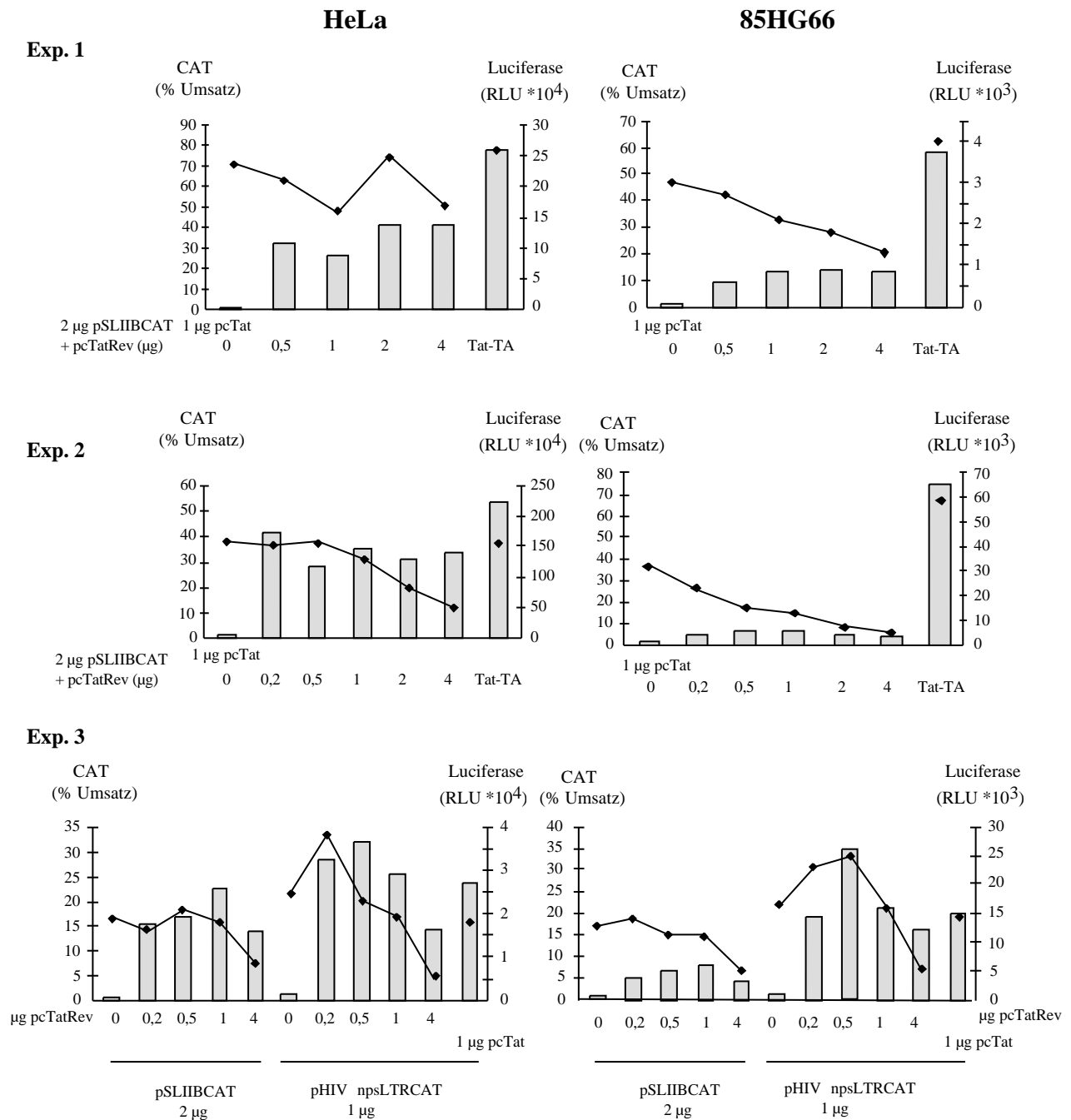
nicht-aktivierte Wert zu niedrig, um eine Induktion berechnen zu können (vgl. Kap. 6.2.3.3.). Die Luciferase-Werte für den Bindungstest waren dabei um etwa 50% höher als in Experiment 1 und 2. Dies legte den Schluß nahe, daß pcTatRev in 85HG66-Zellen weniger stark exprimiert wird bzw. eine größere Menge TatRev zur Aktivierung der CAT-Expression notwendig ist.

Bestätigt wurde diese Annahme durch Experiment 6, das eine nochmals gesteigerte Luciferase-Expression sowie eine Erhöhung der CAT-Expression durch TatRev erkennen ließ. Der CAT-Umsatz stieg von 0,8% auf 9%. Die Luciferase-Werte lagen in einer Größenordnung von  $10^4$ , was der Größenordnung von anderen Experimenten in dieser Zelllinie entspricht (vgl. hierzu Abb. 15 (S. 39) und Abb. 18 (S. 43) zu den Luciferase-Werten der Tat- und Rev-Transaktivierung in 85HG66-Zellen). Demgegenüber wurden jedoch in Experiment 4 Luciferase-Werte derselben Größenordnung erreicht, ohne eine CAT-Expression im Bindungsansatz messen zu können.

Auffällig ist, daß in 85HG66-Zellen der Passage p+x keine CAT-Expression gemessen werden konnte. Dagegen wurde in der Passage p6+x eine CAT-Expression nachgewiesen. Der mit x bezeichnete Wert steht jeweils für die aktuelle Passage nach dem Auftauen der Zellen und lag für alle sechs Experimente zwischen 14 und 23. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurden nach maximal 30 Passagen neue Zellen aufgetaut (vgl. Kap. 3.1.1.). Vor dem Einfrieren von Zellen wurde sichergestellt, daß die Zellen mykoplasmenfrei waren, da diese Kontamination das Transfektionsverhalten beeinflussen kann (Kap. 6.2.1.2.)

Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse ist, daß die im Vorfeld zu diesen Experimenten festgelegten Plasmidkonzentrationen nicht optimal für die Verwendung in 85HG66-Zellen sind. Unter Umständen muß die Konzentration an TatRev erhöht werden, um ausreichend für eine reproduzierbar messbare Aktivierung der CAT-Expression zu sein.

Daher wurde die Menge an pcTatRev zur Verwendung in 85HG66-Zellen im Vergleich zu HeLa-Kontrollzellen titriert. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 26 dargestellt. Für diese Experimente wurde wieder ein neu aufgetautes Aliquot an 85HG66-Zellen verwendet. Die Passagenzahlen waren in der Reihenfolge der Experimente eins bis drei: p6+3+3, p6+3+6 und p6+3+13.



**Abb. 26:** Dargestellt sind drei unabhängige Experimente zur Titration von pcTatRev in 85HG66-Zellen im Vergleich zu HeLa-Kontrollzellen. Die Säulen stellen den CAT-Umsatz in Prozent dar, die Punkte die zugehörigen Luciferase-Messwerte. Als weitere Positivkontrolle und zum Vergleich der Stärke der Aktivierung wurde 1 µg pcTat mit 1 µg pHIV npsLTRCAT transfiziert. Die Werte sind in Experiment 1 und 2 mit „Tat-TA“ (Tat-Transaktivierung) bezeichnet.

Abbildung 26 verdeutlicht, daß die CAT-Expressionen in den Ansätzen mit unterschiedlichen Mengen pcTatRev an pSLIIBCAT in HeLa-Kontrollzellen nicht mehr als 20% voneinander abwichen. Die Luciferase-Werte schwankten in Experiment 1 um weniger als 50% zum Wert ohne Effektor, in Experiment 2 und 3 sank der Luciferase-Wert im Ansatz mit 4 µg pcTatRev auf nur noch 30% bzw. 40% des Wertes ohne Effektor. Das entspricht den in Abbildung 21 (S. 46) aufgeführten Daten.

In 85HG66-Zellen war in beiden Experimenten eine Erhöhung der CAT-Expression durch TatRev zu beobachten. Es zeigte sich jedoch keine auffällige Dosisabhängigkeit zur Menge an pcTatRev, sondern die CAT-Expression blieb über den getesteten Bereich weitestgehend konstant. Dagegen sanken die Luciferase-Werte schon bei der Transfektion mit 0,5 µg pcTatRev deutlich.

Vergleicht man allerdings die Aktivität von TatRev an pSLIIBCAT mit der Aktivität von Tat an pHIV npsLTRCAT, so war letztere insbesondere in Experiment 2 wesentlich höher, wie schon in Tabelle 4 deutlich wurde. Tabelle 4 weist in jedem Experiment eine Tat-Transaktivierung an der HIV-LTR aus, jedoch nur eine geringe bzw. gar keine CAT-Aktivität im Bindungstest mit der modifizierten HIV-LTR.

Berechnet man den CAT-Umsatz aus pSLIIBCAT + 1 µg pcTatRev in Prozent des Umsatzes aus pHIV npsLTRCAT + 1 µg pcTat, so kann dieser Wert als indirektes Maß für die Bindungsstärke von Rev im TatRev-Protein betrachtet werden (vgl. Kap. 3.4.4.). Als Mittelwert der 3 Experimente für 85HG66-Zellen (Abb. 26) ergaben sich 23%. Für die Berechnung in HeLa-Zellen wurde Experiment 1 nicht mit herangezogen, da die Werte für den Ansatz mit 1 µg pcTatRev sowohl für CAT als auch für die Luciferase gegenüber den anderen Werten niedriger sind. Dieses Experiment ist nach den Ergebnissen aus Kap. 3.4.2. nicht repräsentativ und der Rückgang vermutlich auf eine geringere Transfektionseffizienz in diesem einzelnen Ansatz zurückzuführen. Aus den beiden anderen Experimenten ergibt sich ein Wert von 70%, der etwa dem in Kapitel 3.4.4. berechneten Mittelwert von 65% entspricht (Tab. 3). Damit ist die CAT-Expression aufgrund der Rev-Bindung verglichen mit der CAT-Expression aufgrund der Tat-Aktivierung in 85HG66-Zellen mit 23% dreifach niedriger als in den übrigen Zelllinien.

Voraussetzung für diese Berechnung waren die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.3. PcTat und pcTatRev führten, in gleichen Konzentrationen mit pHIV npsLTRCAT transfiziert, zu einer vergleichbaren Aktivierung der CAT-Expression. Daraus lassen sich zwei mögliche Schlußfolgerungen ableiten: Entweder ist die Bindung von Rev an die RNS in der Zelllinie 85HG66 schwächer als in den anderen getesteten Zelllinien oder pcTatRev wird im Vergleich zu pcTat in dieser Zelllinie wesentlich schwächer exprimiert.

Um zu klären, ob Tat in 85HG66-Zellen im Kontext des Fusionsproteins TatRev z. B. aufgrund eines zellspezifischen Einflusses geringere Aktivität besitzt oder ob TatRev schwächer exprimiert wird als in Kontrollzellen, wurde in Experiment 3 der Abbildung 26 die Menge an pcTatRev nicht nur an pSLIIBCAT, sondern auch an pHIV npsLTRCAT titriert. Tabelle 5 gibt die Rohdaten und Induktionen aus diesem Experiment im Überblick wieder.

pcTatRev ( $\mu\text{g}$ )	85HG66			HeLa		
	CAT-Umsatz (%)	Luciferase (RLU)	Induktion	CAT-Umsatz (%)	Luciferase (RLU)	Induktion
0	1,5	11171	--	1,3	253556	--
0,2	19,2	23646	13	28,1	380449	21
0,5	34,5	27742	23,5	31,7	234684	24
<b>1</b>	21	<b>14522</b>	<b>14,3</b>	25,4	<b>185652</b>	<b>19,4</b>
4	16,3	4573	11,2	14,3	41340	11
<b>0 + 1<math>\mu\text{g}</math> pcTat</b>	19,9	<b>14208</b>	<b>13,6</b>	23,4	<b>176147</b>	<b>17,8</b>

**Tab. 5:** Die Tabelle zeigt die Rohdaten und Induktionen des Experimentes 3 (Abb. 26), einer Titration von pcTatRev an der HIV-LTR. Jeder Ansatz enthielt 1  $\mu\text{g}$  pHIV npsLTRCAT. Es wurden 85HG66-Astrozytomzellen mit HeLa-Kontrollzellen verglichen. Zu beachten ist, daß für die CAT-Messung in 85HG66 eine 7,5fach größere Menge an Gesamtprotein eingesetzt wurde als für die Messung in HeLa-Zellen. Daher sind die CAT-Umsätze (in %) nicht direkt zu vergleichen. Die unterschiedliche Proteinverdünnung korreliert mit den in HeLa-Zellen etwa 10fach höheren Luciferasewerten. Die für jede Zelllinie zu vergleichenden Werte unter Verwendung von 1  $\mu\text{g}$  Effektor sind hervorgehoben.

Die Transaktivierungskapazität von TatRev an der HIV-LTR ist demnach auch in 85HG66-Zellen vergleichbar der von Tat. Die Werte mit je 1  $\mu\text{g}$  pcTat bzw. pcTatRev sind sehr ähnlich. Der CAT-Umsatz liegt bei 19,9 und 21 Prozent, die Induktion berechnet sich mit 13,6 und 14,3 und auch die Luciferase zeigt einen nahezu identischen Wert, der mit dem Wert im Ansatz ohne Effektor übereinstimmt. Eine geringere Menge TatRev führt sogar zu einer höheren CAT-Expression, jedoch sind auch die Luciferase-Werte gegenüber dem Ansatz ohne Effektor erhöht. Dieselbe Tendenz zeichnete sich auch in den Kontrollzellen ab und wurde schon in Kap. 3.4.2. bei der Titration von TatRev an pSLIIBCAT in HeLa-Zellen festgestellt. Ein unspezifischer stimulatorischer Einfluß geringer Mengen Tat kann in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden. Es wurden in jedem Fall nur die Ansätze berücksichtigt, in denen die Luciferase-Werte dem Wert im Ansatz ohne Effektor entsprachen. Ansätze mit erhöhten oder niedrigeren Luciferase-Werten wurden nicht berücksichtigt.

Nimmt man diese Daten zusammen, kann festgehalten werden, daß die verminderte CAT-Expression in 85HG66-Zellen im Bindungsansatz weder auf eine unzureichende Transfektionseffizienz noch auf eine mangelnde Expression oder Aktivität von TatRev im Kontext dieser Zellen zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß das Bindungsverhalten von Rev in 85HG66-Zellen gegenüber den anderen getesteten Zelllinien beeinträchtigt ist.

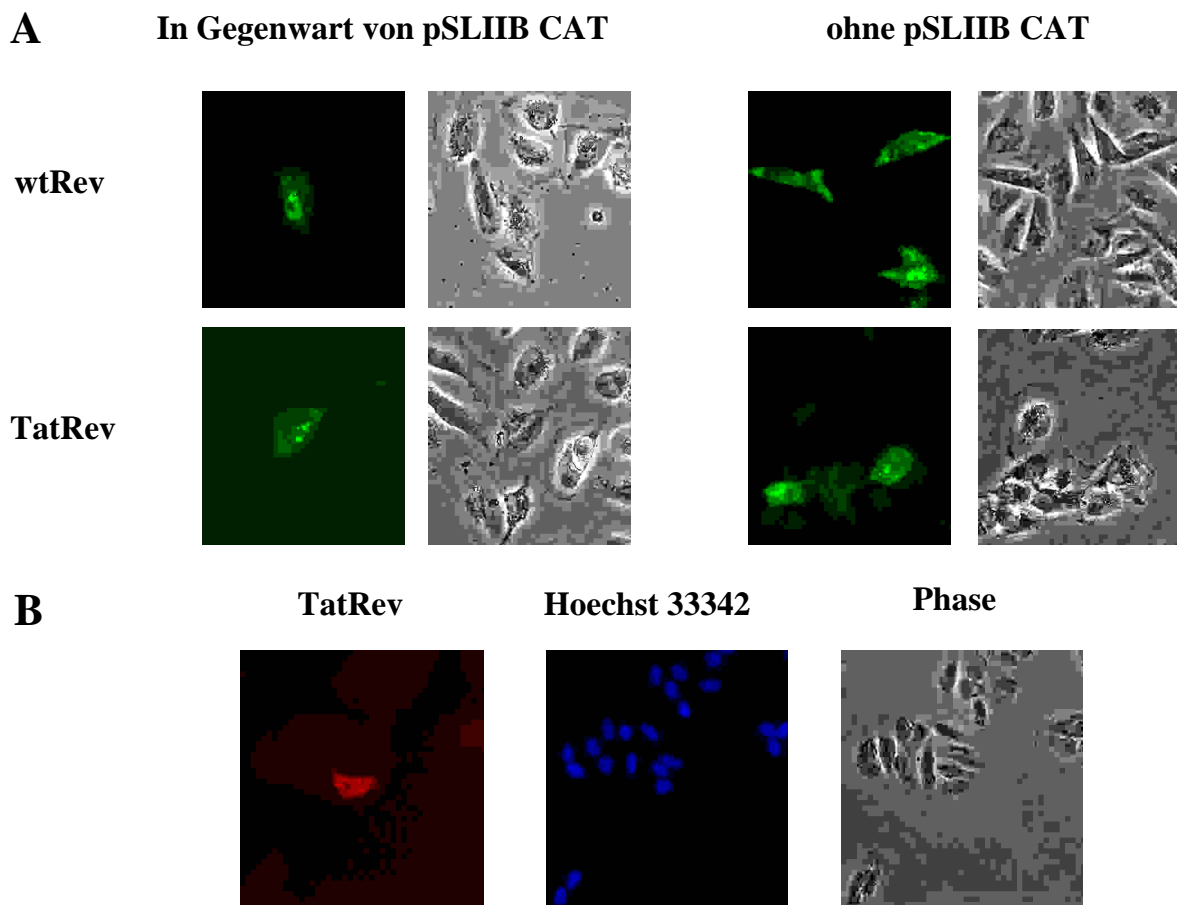
### 3.4.6. Die Lokalisation von TatRev in 85HG66

Analog zu den in Kap. 3.4.3. dargestellten Lokalisationsstudien wurde die Lokalisation von TatRev auch in 85HG66-Astrozytomzellen untersucht. Insbesondere da für diese Zelllinie nur eine schwache Bindung messbar war, sollte auf Einzelzellebene bestätigt werden, daß TatRev in

den Zellen ausreichend exprimiert wird und im Zellkern sowie im Zytoplasma analog zu den anderen Zelllinien lokalisiert.

Abbildung 27 zeigt, daß TatRevGFP in den Zellen exprimiert wird und im Zytoplasma und den Nucleoli der Zellen lokalisiert. Die Anwesenheit des Reporters pSLIIBCAT hat keine Änderung der Lokalisation zur Folge (Kap. 3.4.3.). Es konnte ausgeschlossen werden, daß Tat die Lokalisation beeinflusst und damit das Ergebnis des Bindungstests verändert. In beiden Ansätzen (mit und ohne pSLIIBCAT) ist auch ein Teil des Proteins im Zellkern. Dieser Befund ergänzt die Daten aus der Titration von TatRev an der HIV-LTR (Abb. 26, Exp. 3). Dort wurde gezeigt, daß TatRev in 85HG66-Zellen funktionell ist.

Ebenso wurde die indirekte Immunfluoreszenz im Ansatz ohne Reporterplasmid durchgeführt, um analog zu Kap. 3.4.3. einen Einfluß auf die Lokalisation durch die Größe des Fusionskonstruktes und/oder die Fusion an GFP ausschließen zu können. Durch die Verwendung eines polyklonalen Kaninchen anti Rev Antikörpers konnte bestätigt werden, daß TatRev in 85HG66-Zellen exprimiert wird und die Lokalisation sich nicht von der TatRev-Lokalisation in den anderen untersuchten Zelllinien unterscheidet.



**Abb. 27:** A zeigt die Lokalisation von TatRevGFP in 85HG66-Astrozytomzellen in Gegenwart und Abwesenheit des Reporterplasmides pSLIIBCAT in lebenden Zellen. B zeigt die Lokalisation von TatRev in fixierten Zellen ohne pSLIIBCAT in der indirekten Immunfluoreszenz.

### 3.5. Die Bindung von Rev an SLIIB kann spezifisch gehemmt werden

Setzt man voraus, daß die in Kap. 3.4.2. aufgezeigte Erhöhung der CAT-Expression nur auf die Bindung von Rev an SLIIB zurückzuführen ist, so müßte diese Bindung durch die Anwesenheit von zusätzlichem Rev-Protein dosisabhängig zu hemmen sein. Um diese Annahme zu prüfen, wurden für 4 Zelllinien (die Kontrollzelllinien HeLa und HEK293 und die Astrozytomzelllinien U87 und U138) Experimente durchgeführt, in denen zum Bindungsansatz steigende Mengen Kompetitorplasmid kotransfiziert wurden. Da die Zelllinien HeLa und U138 bzw. HEK293 und U87 eine ähnliche Expressionsstärke haben (siehe die Luciferase-Daten aus Abb. 15 und 18, S. 39 und 43), sind diese Zellpaare gut vergleichbar. Als Kompetitor wurden wtRev sowie die trans-dominant negative Mutante RevM10BL verwendet. RevM10BL besitzt kein funktionsfähiges nukleäres Export Signal (NES) mehr (Abb. 4, S. 9), verbleibt im Zellkern und ist nicht mehr funktionell (Stauber, R. et al., 1995).

Die verminderte Rev-Transaktivierung in humanen Astrozyten ist mit einer auffälligen zytoplasmatischen Lokalisation von Rev in diesen Zellen korreliert ((Ludwig, E. et al., 1999), Kap. 1.1.2.2.2.), dagegen lokalisiert das Protein in Zellen mit unverminderter Rev-Transaktivierung nukleär/nukleolär. RevM10BL dagegen ist in beiden Zelllinien nukleär/nukleolär (Ludwig, E. et al., 1999). Die Bindung von Rev an die RNS findet im Zellkern statt; da RevM10BL dort akkumuliert, würde man eine Hemmung schon durch eine geringere Menge RevM10BL im Vergleich zu wtRev erwarten. Darüber hinaus besitzt das Expressionsplasmid pBsRevM10BL den HIV-LTR-Promotor, und die Expression von RevM10BL ist damit Tat-abhängig. Es besteht auch eine Konkurrenz um Tat.

Als wtRev-Expressionsplasmid wurde pcRev verwendet. PcRev unterscheidet sich von pcTatRev und pcTat nur durch die kodierenden Sequenzen. In Kap. 3.3.3. wurde für pcTatRev und pcTat eine vergleichbare Aktivierung der CAT-Expression aufgezeigt. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß gleiche Mengen der Plasmide der pc-Reihe in einer Zelllinie etwa gleich stark exprimiert werden, da sie den gleichen Promotor besitzen.

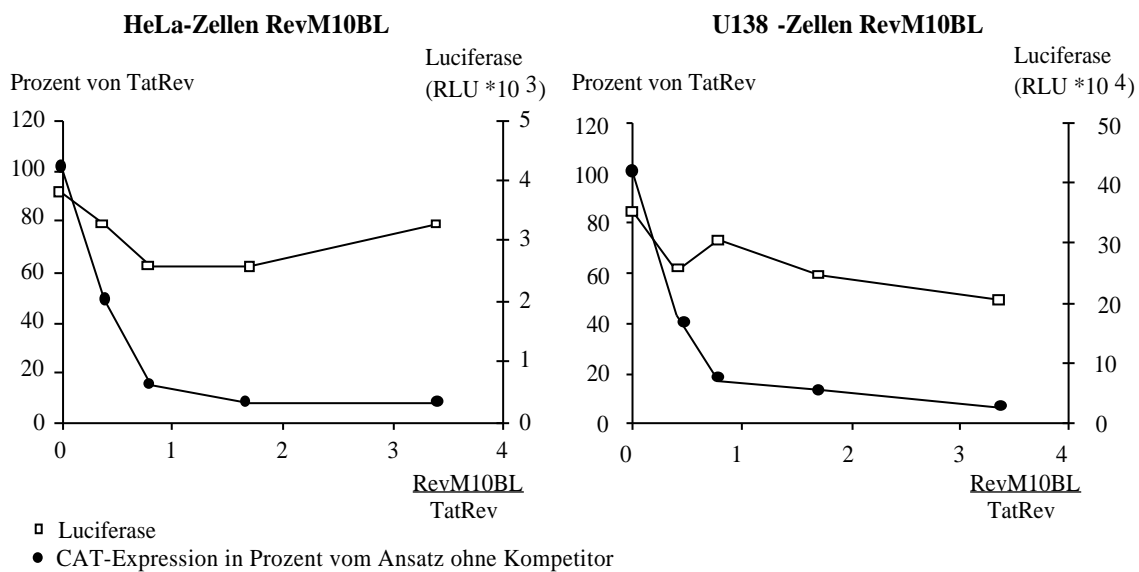
Die Kompetitionen wurden mit bis zu 8fachem molarem Überschuß, in Einzelfällen bis zu 28fachem Überschuß, des jeweiligen Kompetitorplasmids durchgeführt. Der Ansatz bestand aus der Transfektion zur Bindung, d. h. 2 µg pSLIIBCAT und 1 µg pcTatRev, der Kontrolle mit 2 µg pSLIIBCAT und 1 µg pcTat und den Kompetitionsansätzen 2 µg pSLIIBCAT, 1 µg pcTatRev und unterschiedliche Mengen Kompetitorplasmid. Für die Berechnung wurde zunächst der CAT-Umsatz aus der Transfektion pSLIIBCAT + pcTat von den übrigen Werten subtrahiert, um die Ergebnisse um die von einer Bindung unabhängige CAT-Aktivierung zu korrigieren. Die Kompetitionskurven verlaufen somit gegen Null.

Der CAT-Umsatz aus pSLIIBCAT + pcTatRev wurde gleich 100% gesetzt und die CAT-Werte aus den Kompetitionen darauf bezogen. Die Y-Achse der folgenden sechs Abbildungen gibt demnach die Höhe des CAT-Umsatzes in der jeweiligen Konkurrenz relativ zum Wert ohne Kompetitor an. Die X-Achse gibt das molare Verhältnis Kompetitorplasmid zur Menge an pcTatRev an.

### 3.5.1. Die Inhibition der Rev/RNS-Bindung durch RevM10BL

In Abbildung 28 ist zunächst ein Beispiel für eine Transfektion zur Konkurrenz der Bindung mit RevM10BL gezeigt. Die beiden Zelllinien HeLa und U138 wurden parallel transfiziert. Die Luciferase-Werte aus jedem Ansatz sind als Mittelwert aus der Doppelbestimmung mit aufgeführt. Die Luciferase-Expression unterlag in diesen Experimenten einer ungewöhnlich hohen Schwankung. Es wurde jedoch wiederum darauf geachtet, daß die Schwankung 50% nicht überschritt. Im angegebenen Beispiel aus HeLa-Zellen sank die Luciferase-Expression im Wert mit 0,8facher Menge an Kompetitor auf 70% des Wertes ohne Kompetitor. Dagegen sank der CAT-Wert auf 14%. Obwohl der Luciferase-Wert bei zunehmender Kompetitor-Menge wieder anstieg, folgte der CAT-Wert dieser Tendenz nicht. In U138-Zellen betrug der Luciferase-Wert im Ansatz mit 0,8facher Kompetitormenge 85% des Referenzwertes ohne Kompetitor, der CAT-Wert nur noch 17%. Da die Luciferase-Kurven nicht parallel zu den CAT-Kurven verliefen, war ein generell negativer Einfluß des Transfektionsansatzes auf die Zellen auszuschließen. Die Schwankung war spezifisch für die Luciferase-Expression, z. B. aufgrund der unterschiedlichen Mengen Expressionsplasmid pro Ansatz. Abbildung 31 stellt ein Kontrollexperiment dar, das zeigt, daß auch steigende Mengen eines unabhängigen Expressionsplasmides (pFred143 zur GFP-Expression) keine Auswirkungen auf die CAT-Expression haben.

Um die Konkurrenzexperimente besser vergleichen zu können, wurde die Menge an Kompetitor relativ zur TatRev-Menge berechnet, bei der die CAT-Expression aufgrund der Rev/SLIIB-Bindung nur noch 50% des Wertes ohne Kompetitor beträgt. Dieser Wert lag im gezeigten Beispiel für HeLa-Zellen bei 0,4; das heißt schon die 0,4fache molare Menge an Kompetitorplasmid relativ zur molaren Menge an pcTatRev reichte aus, um die CAT-Expression um 50% zu reduzieren. Für U138-Zellen betrug der Wert aus diesem Beispiel 0,35.



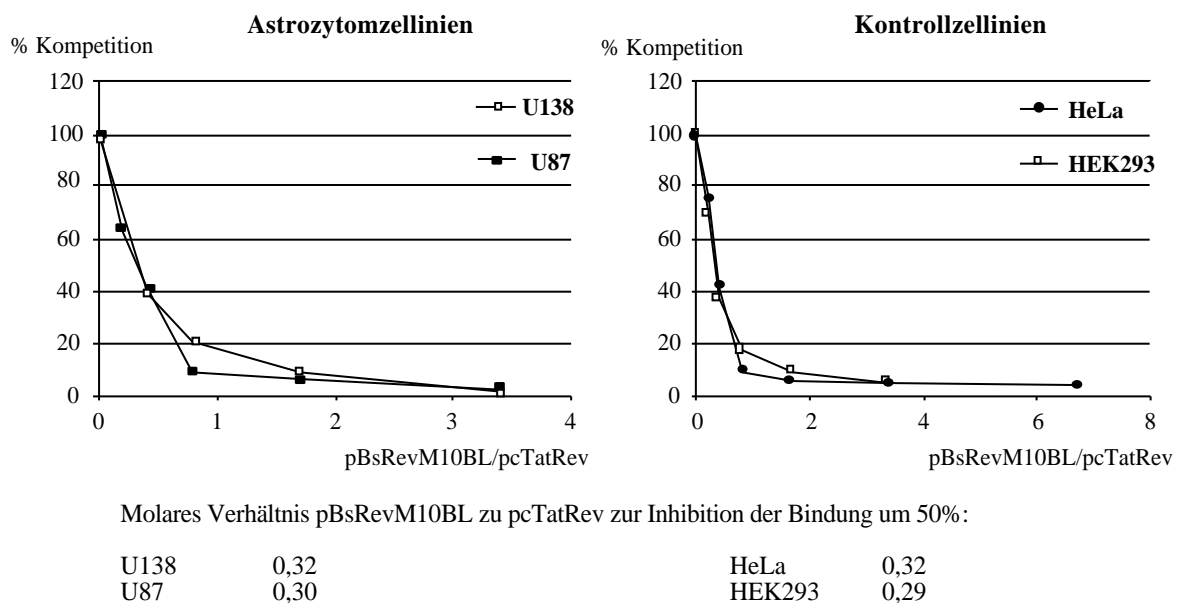
**Abb. 28:** Die Hemmung der Rev/RNS-Bindung durch Kotransfektion des Bindungsansatzes mit pBsRevM10BL in HeLa-Kontrollzellen und U138-Astrozytomzellen. Die Luciferase-Werte aus den einzelnen Ansätzen sind zum Vergleich mit angegeben. Alle Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.



Abbildung 29 faßt die Ergebnisse aus den Wettbewerbsstudien mit RevM10BL in zwei Kontrollzelllinien und zwei Astrozytomzelllinien zusammen. Wie schon am Beispiel aus Abbildung 28 beschrieben worden ist, wurden die Werte um den CAT-Umsatz des Ansatzes pSLIIBCAT + pcTat berichtigt und dann als Prozent vom Bindungsansatz berechnet. Die Kurven stellen Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten dar.

In allen Zelllinien zeigte sich eine dosisabhängige Inhibition der CAT-Expression durch die Gegenwart des Kompetitors. Schon bei der Transfektion von jeweils 1 µg pBsRevM10BL und pcTatRev, also einem Verhältnis 1:1, war die Bindung fast vollständig inhibiert. Berechnete man wie im Beispiel aus Abbildung 28 die Kompetitormenge relativ zu TatRev, bei der die CAT-Expression um 50% gesunken war, betrug der Wert in allen Zelllinien etwa 0,3. Die genauen Werte sind der Abbildung 29 zu entnehmen.

Die geringe Menge Kompetitor gegenüber TatRev ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß RevM10BL im Zellkern akkumuliert und damit in dem Zellkompartiment, in dem die Bindung stattfindet. Darüber hinaus ist der Promotor in diesem Plasmid der HIV-LTR, womit sich auch eine Konkurrenz um Tat aus dem TatRev-Fusionsprotein ergibt.



**Abb. 29:** Die Konkurrenz der Bindung Rev/SLIIB durch RevM10BL in Astrozytom- und Kontrollzelllinien. Die Punkte stellen die Messwerte als Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten der Kontrollzelllinien dar; für die Zelllinie U87 sind zwei Experimente zusammengefaßt, für U138-Zellen vier. Die Mittelwerte wurden auf den Ansatz ohne Kompetitor bezogen, der gleich 100% gesetzt wurde.

### 3.5.2. Die Inhibition der Rev/RNS-Bindung mit wtRev

Der in Kap. 3.5.1. für RevM10BL beschriebene experimentelle Ansatz wurde auch mit wtRev unter Verwendung des Kompetitorplasmides pcRev durchgeführt. Abbildung 30 faßt die Ergebnisse zusammen. Auch wtRev inhibiert die Bindung Rev/RNS in allen vier Zelllinien

dosisabhängig. Die Hemmung durch den Wildtyp benötigt jedoch insgesamt eine größere Menge Kompetitorplasmid als die äquivalente Hemmung durch RevM10BL.

Auffällig ist, daß bei der Kotransfektion einer geringeren Menge Kompetitorplasmid (pcRev zu pcTatRev 1:2) mit Ausnahme der Zelllinie HEK293 zunächst eine Aktivierung der CAT-Expression zu verzeichnen war. Der Anstieg ging nicht mit einer Erhöhung der Luciferase-Werte einher, so daß ein Einfluß der Transfektion selber (z. B. höhere Transfektionseffizienz in diesem Ansatz) auszuschließen war (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt wurde im Rahmen der Konkurrenz mit RevM10BL nicht beobachtet.

In HEK293-Zellen wurde ebenfalls keine anfängliche Erhöhung der CAT-Expression festgestellt. Diese Zelllinie hatte eine allgemein sehr hohe Expressionsrate, wie an den Luciferase-Werten, die eine Größenordnung von  $10^7$  pro 50 µg Gesamtprotein erreichten, zu erkennen war (vgl. Abb. 15 und 18, S. 39 und 43). Darüber hinaus war Rev in diesen Zellen kernlokalisiert, TatRev dagegen zu großen Teilen zytoplasmatisch (Abb. 24, S. 52). Die Astrozytomzelllinie U87 zeigte auch hohe Luciferase-Werte, die Verfügbarkeit von Rev im Kern wurde jedoch durch seine vermehrte zytoplasmatische Akkumulation eingeschränkt.

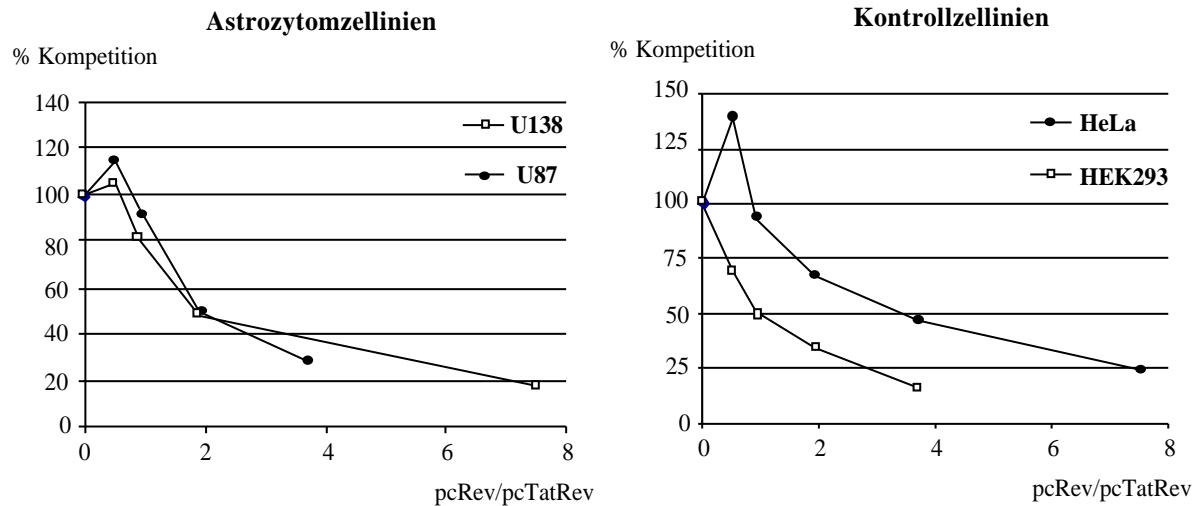
Wurde für die Hemmung in HEK293-Zellen eine Bindungs-defekte Rev-Mutante verwendet, die anstelle der Rev-NLS die Tat-NLS enthält, so konnte auch in diesen Zellen eine Erhöhung der CAT-Expression gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß die Oligomerisierung, die in dieser Mutante nicht eingeschränkt ist, bei diesem Befund eine Rolle spielte.

Zum genaueren Vergleich ist wieder das molare Verhältnis an Kompetitor zu TatRev aufgeführt, das nötig war, um die Bindung um 50% zu hemmen. Die Werte waren weniger einheitlich als für RevM10BL. Für die Astrozyten wurde ein Wert von 1,8 bzw. 1,9 ermittelt. Damit wird gegenüber der Menge an RevM10BL-Expressionsplasmid eine größere Menge wtRev-Plasmid benötigt, um eine vergleichbare Hemmung zu erhalten. Dieses Ergebnis entspricht aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation dieser Kompetitoren in Astrozyten der Erwartung.

Für HEK293-Zellen lag der Wert mit 0,9 um etwa die Hälfte niedriger. Diese Beobachtung ist mit der Lokalisation von Rev hauptsächlich im Kern dieser Zellen im Gegensatz zur zytoplasmatischen Lokalisation in Astrozyten zu begründen. Der 3fache Unterschied im Quotient zur Menge pBsRevM10BL resultiert daraus, daß RevM10BL einen transdominant negativen Phänotyp besitzt und darüber hinaus, wie schon besprochen, zur Expression von der HIV LTR die Anwesenheit von Tat nötig ist.

Abweichend war dagegen der Wert für HeLa-Zellen. Erst bei einem 3,4fachen molaren Überschuß an Kompetitorplasmid wurde eine Hemmung der CAT-Expression um 50% erreicht. Bei diesem Wert ist jedoch zu beachten, daß er sich als Mittelwert aus nur zwei Experimenten ergibt, deren Einzelwerte mit 1,8 und 5,1 stark voneinander abweichen.

Die Expressionsstärke von pcRev und pcTatRev konnte nicht quantifiziert werden. Western Blots der Proteinlysate konnten nicht ausgewertet werden, da offensichtlich der zur Verfügung stehende anti Rev Antikörper das HXB-3 Rev (pcRev, pcTatRev, vgl. Abb. 8, S. 27) im Gegensatz zu HXB-2 Rev im Western Blot nicht erkannte.



Molares Verhältnis pcRev zu pcTatRev zur Inhibition der Bindung um 50%:

U138	1,8	HeLa	3,4
U87	1,9	HEK293	0,9

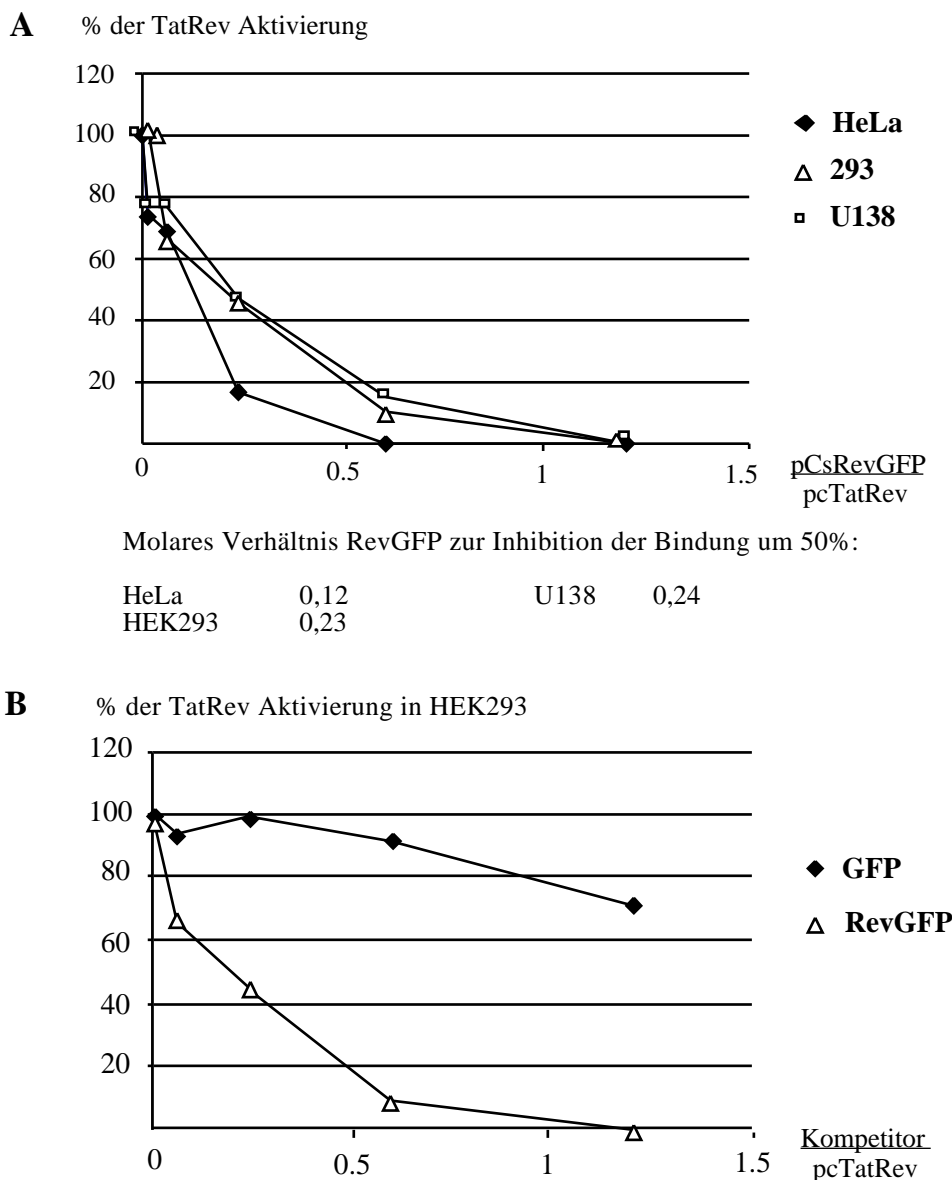
**Abb. 30:** Die Abbildung zeigt die Konkurrenz der Bindung Rev/SLIIB durch wtRev in Astrozytom- und Kontrollzelllinien. Die Punkte stellen die Messwerte als Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar, für HeLa-Zellen sind zwei Experimente zusammengefasst. Die Mittelwerte wurden auf den Ansatz ohne Kompetitor bezogen, der gleich 100% gesetzt wurde. Für Details vgl. Text.

Um einen weiteren Vergleichswert insbesondere für HeLa-Zellen zu erhalten, wurde die wtRev-Kompetition mit dem Rev-Expressionsplasmid pCsRevGFP wiederholt. In diesem Plasmid, das auch für die Lokalisationsstudien aus Abbildung 24 (S. 52) verwendet wurde, steht die Expression eines Rev-GFP-Fusionsproteins unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Die Rev-Sequenzen stammen aus dem HIV-Isolat HXB-2, wohingegen pcRev und pcTatRev die HXB-3-Rev-Sequenzen enthalten (Abb. 8, S. 27).

Ein Experiment in U138-Zellen unter der Verwendung von pCsRevGFP und pcTatRev im Verhältnis 1:1 ergab bereits eine vollständige Hemmung der CAT-Expression (Daten nicht gezeigt). pCsRevGFP enthält zwei Modifikationen, die zu einer verstärkten Expression führen. Das ATG-Startkodon für RevGFP ist der HIV-1 Tat-Sequenz entnommen und wird sehr stark initiiert. Der CMV-Promotor enthält eine kurze Deletion, die ebenfalls zu einer verstärkten Expression führt (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg, persönliche Mitteilung). Daher wurden die Wettbewerbsstudien mit pCsRevGFP bei einer Konzentration von Kompetitor zu pcTatRev 0,0125:1 begonnen.

Abbildung 31A zeigt die Konkurrenz der Bindung Rev/SLIIB mit RevGFP in U138-Astrozytomzellen und HeLa- sowie HEK293-Kontrollzellen. Die CAT-Expression wurde schon durch eine geringe Menge Kompetitor in allen drei Zelllinien deutlich gehemmt. Die Werte für die 50%ige Hemmung der CAT-Expression lagen für HeLa-Zellen bei 0,12, für HEK293-Zellen bei 0,23 und für U138-Astrozytomzellen bei 0,24.

Abbildung 31B stellt die Kontrolltransfektion für HEK293-Zellen dar. Die Hemmung durch RevGFP entspricht dem Experiment aus Abbildung 31A. Parallel wurden auch steigende Mengen pFred143 zum Bindungsansatz transfiziert. Dieses Plasmid exprimiert GFP und unterscheidet sich von pCsRevGFP nur durch das Fehlen der Rev-Sequenzen. Im Gegensatz zu RevGFP inhibierte GFP die CAT-Expression im Bindungsansatz nicht. Der CAT-Wert in Gegenwart eines 1,25fachen molaren Überschusses an pFred143 sank auf 70% des Wertes im Bindungsansatz, ging jedoch mit einem Abfall des Luciferase-Wertes auf nur noch 44% des Wertes ohne pFred143 einher. Diese Menge an GFP war offensichtlich toxisch für die Zellen. Dagegen blieben die Luciferase-Werte für die Ansätze mit pCsRevGFP konstant (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 31:** Die Abbildung zeigt in A die Inhibition der Rev/RNS-Bindung mit einem RevGFP-Fusionsprotein in zwei Kontrollzelllinien und einer Astrozytomzelllinie. 31B zeigt das Experiment für HEK293-Zellen mit einer parallelen Konkurrenz mit GFP als Negativkontrolle.

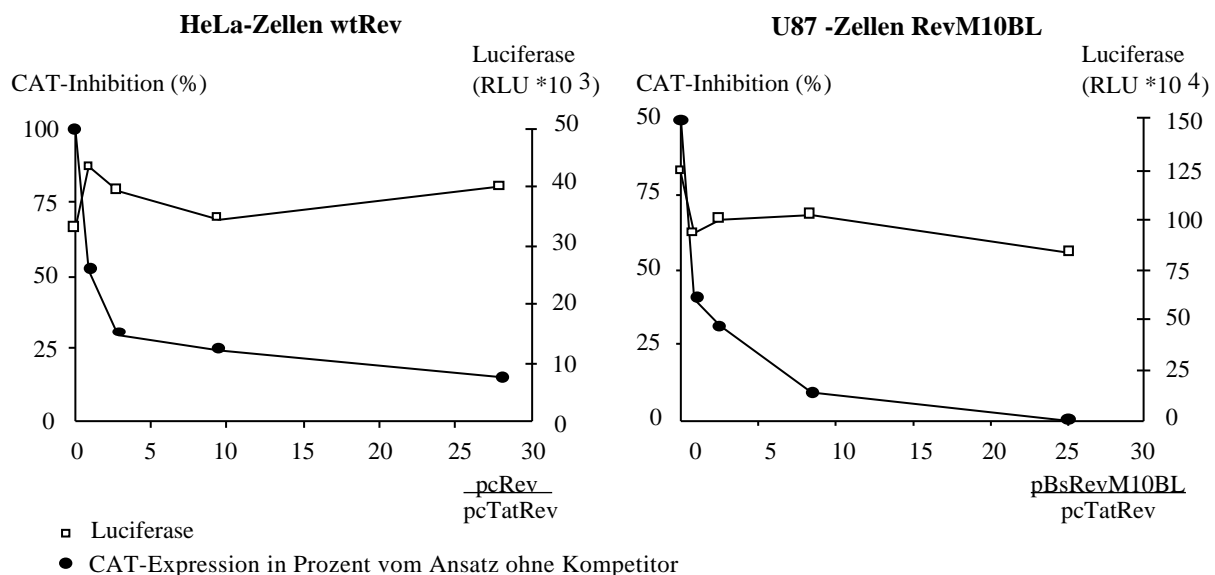
### 3.5.3. Die Inhibition der Bindung mit hohem Kompetitorüberschuß

Zur weiteren Kontrolle der Spezifität der Inhibition wurden in ausgewählten Ansätzen auch Transfektionen mit niedrigeren Gesamtplasmidkonzentrationen durchgeführt, die einen höheren Überschuß an Kompetitor erlaubten. Eine zu hohe Gesamtplasmidmenge könnte toxisch für die Zellen sein und die Ergebnisse der Kompetitionen beeinflussen.

Von jedem Effektorplasmid wurde ein Zehntel der Konzentration aus den in Abbildung 29 und 30 beschriebenen Experimente verwendet, also im Bindungsansatz 2 µg pSLIIBCAT und 0,1 µg pcTatRev. Die Kompetitoren wurden in einer Konzentration zwischen 0,1 µg und 3 µg eingesetzt. Diese Variation ermöglichte einen bis zu 30fachen Überschuß Kompetitorplasmid gegenüber pcTatRev.

In Abbildung 32A ist die Konkurrenz mit pcRev in HeLa-Zellen gezeigt, in 32B die Konkurrenz mit pBsRevM10BL in U87-Zellen. Der 50%-Wert liegt für HeLa-Zellen bei 0,92 und für U87-Zellen bei 0,76. In HeLa-Zellen konnte also schon mit einer geringeren Kompetitormenge als in den Experimenten aus Abbildung 30 eine Inhibition der Bindung mit pcRev erreicht werden. Die Inhibition entspricht etwa derjenigen, die in Abbildung 30 für HEK293-Zellen berechnet wurde. Nach einer Konkurrenz auf 30% der CAT-Expression bei einem molaren Verhältnis von Rev zu TatRev von 2,8 wurde jedoch auch mit einem 28fachen Überschuß wtRev noch keine vollständige Hemmung erreicht. Die Luciferase-Werte blieben im vorgegebenen Rahmen konstant.

In U87-Zellen lag der 50%-Wert etwas höher als in den Experimenten aus Abbildung 30, es wurde also eine größere Kompetitormenge als in den zuvor erläuterten Experimenten benötigt. Es ist jedoch zu beachten, daß es sich hierbei um Einzelexperimente handelt.



**Abb. 32:** Die Konkurrenz der CAT-Expression im Bindungsansatz für HeLa-Zellen mit wtRev (A, bis zu 28facher Überschuß Kompetitor) und für U87-Astrozytomzellen mit RevM10BL (B, bis zu 25facher Überschuß Kompetitor). Die Punkte zeigen die CAT-Expression als Prozent der CAT-Expression im Bindungsansatz, die offenen Symbole die zugehörigen Luciferase-Messwerte. Die Daten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Die Ergebnisse aus den Kompetitionen haben somit die Spezifität der festgestellten Bindung von Rev an SLIIB in Astrozyten und Kontrollzellen bestätigt. Dabei wurden in Transfektionen mit verschiedenen Kompetitor-Expressionsplasmiden unterschiedliche Plasmidmengen zur Inhibition der Bindung um 50% benötigt. Diese Unterschiede waren vermutlich auf ein Zusammenspiel der Stärke der Kompetitor-Expression und der Lokalisation der Kompetitoren in der Zelle zurückzuführen. Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung wurden Luciferase-Werte und die Kotransfektion mit GFP, die keine Inhibition der CAT-Expression zur Folge hatte, gezeigt. Insgesamt konnten keine bedeutenden Unterschiede zwischen Astrozyten und Kontrollzellen gefunden werden.

#### **3.5.4. Die Inhibition der Rev/RNS-Bindung durch RNS**

In einem ähnlichen Kompetitionsansatz wie in Kap. 3.5.1. bis 3.5.3. beschrieben sollte die Bindung Rev/RNS auch durch einen Überschuß an SLIIB zu inhibieren sein. SLIIB konkurriert um die Bindung von TatRev. Um diese Theorie zu prüfen, wurden die Plasmide pcRRE und pcRRE SLIIB verwendet, die zwar transkribiert werden, die RNS wird jedoch nicht translatiert.

Die beiden Plasmide pcRRE und pcRRE SLIIB haben denselben Vektorhintergrund wie pcTatRev, jedoch wurde statt der Protein-kodierenden Sequenzen die RRE bzw. die RRE ohne die SLIIB-Sequenzen hineinkloniert. PcRRE sollte in diesem Ansatz mit pSLIIBCAT um die Bindung an TatRev kompetieren, wohingegen pcRRE SLIIB die Negativkontrolle darstellt. Da für die Bindung von Rev an RRE die initiale Bindung an SLIIB essentiell ist (Kap. 1.1.2.2.2.), sollte an einer RRE ohne SLIIB keine Bindung stattfinden. Dies wurde in *in vitro* Experimenten von Stauber et al. bestätigt (Stauber, R. H. et al., 1998).

In Abbildung 33 werden ausgewählte Ansätze zu Wettbewerbsexperimenten in HeLa- und U87-Zellen dargestellt. Die parallel ermittelten Luciferase-Daten sind ebenfalls graphisch dargestellt. Unter Verwendung dieser Kompetitorplasmide waren keine reproduzierbaren Daten zu erzielen. Die Luciferase-Werte schwankten um einen Faktor von 2,5 bis 6, so daß diese Experimente nicht auszuwerten waren. Schon eine geringe Menge pcRRE bzw. pcRRE SLIIB (0,1 µg, Daten nicht gezeigt) hatte einen deutlichen Rückgang der Luciferase-Expression zur Folge. Ferner war auffällig, daß die Luciferase- und die CAT-Kurven der jeweiligen Transfektionen deutlich parallel verlaufen. Effekte auf die CAT-Expression waren daher vermutlich unspezifisch, da die Luciferase-Expression im gleichen Maße beeinträchtigt wurde.

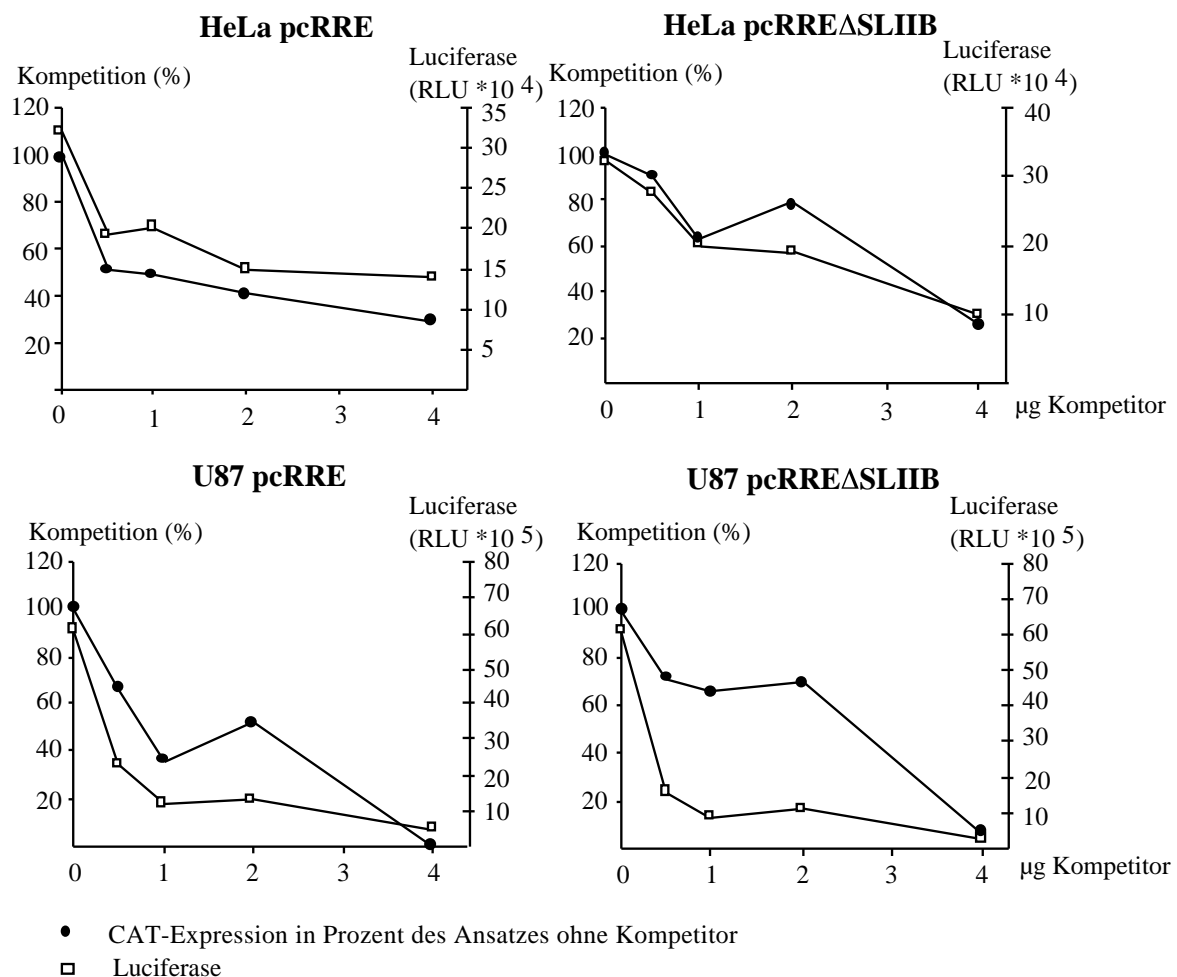
Diese Experimente wurden auch mit Plasmiden durchgeführt, die die entsprechenden RRE- und RRE SLIIB-Sequenzen in antisense-Orientierung enthielten. Auch in diesem Fall waren keine reproduzierbaren Daten zu erhalten, die Transfektion der Plasmide ging immer mit einem Rückgang der Luciferase-Expression einher (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, daß die RRE-exprimierenden Plasmide toxisch für die Zellen und daher in diesen Experimenten nicht einzusetzen waren.

Wurde dagegen ein Plasmid verwendet, das keine RRE, jedoch die TAR enthielt, konnte die CAT-Expression in einer Transfektion mit HeLa-Zellen und U373-Zellen vollständig gehemmt werden (Daten nicht gezeigt). Die TAR in diesem Plasmid bindet an den Tat-Teil des TatRev-

Fusionsproteins, so daß dieses nicht mehr für die Bindung an SLIIB zur Verfügung steht. Die Ansätze wurden mit einem 4fachen Überschuß Kompetitorplasmid gegenüber pSLIIBCAT durchgeführt, allerdings war auch dabei ein leichter Rückgang der Luciferase-Werte gegenüber dem Wert ohne Kompetitor zu verzeichnen.

Möglicherweise exprimieren die beschriebenen RRE-Konstrukte eine zu kurze RNS, die sich nicht korrekt in die komplexe Sekundärstruktur der RRE falten kann. Dann kann die Bindung durch Rev nicht stattfinden. Die RNS könnte in den Zellen rasch degradiert oder in einem bestimmten Zellkompartiment akkumuliert werden, was zu der beobachteten Toxizität für die Zellen führte. Daher wurde im Reporterplasmid pDM128 (Kap. 3.2.) das *cat*-Gen deletiert, so daß eine RNS aus *env*-Sequenzen inklusive der RRE exprimiert wurde. Die Expression von pDM128 in allen Zelllinien wurde in Kap. 3.2. gezeigt. Jedoch führte auch die Kofektion dieses Plasmides nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen, die CAT-Werte unterlagen wieder hohen Schwankungen (Daten nicht gezeigt).



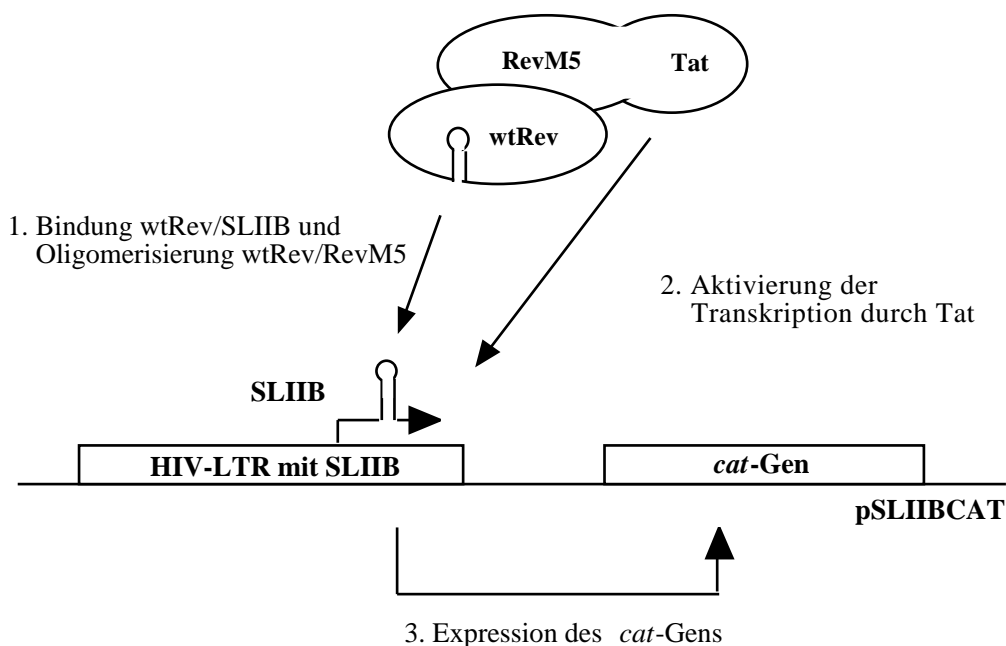
**Abb. 33:** Verschiedene Transfektionsexperimente zur Inhibition der Rev/SLIIB-Bindung mit RNS. Punkte stellen die CAT-Expression als Prozent der CAT-Expression im Ansatz ohne Kompetitor dar, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde. Offene Symbole kennzeichnen die zugehörigen Luciferase-Daten.

### 3.6. Die Oligomerisierung von Rev in humanen Astrozyten

#### 3.6.1. Ein *in vivo* System zur Prüfung der Rev-Rev Oligomerisierung in Zelllinien

Der in Kapitel 3.4. dieser Arbeit beschriebene Bindungstest kann in einer modifizierten Anwendung zur *in vivo* Untersuchung der Oligomerisierungseigenschaften von Rev im Kontext verschiedener Zelltypen benutzt werden. Das Prinzip des Oligomerisierungstests ist in Abbildung 34 schematisch gezeigt.

Anstelle des TatRev-Fusionsproteins wurde ein Fusionsprotein aus Tat und der Bindungsdefekten Mutante RevM5 verwendet (zur Sequenz von RevM5 vgl. Abb. 4, S. 9). RevM5 wurde von Malim et al. 1989 charakterisiert (Malim, M. H. et al., 1989), der Bindungsdefekt wurde von Thomas et al. bestätigt (Thomas, S. L. et al., 1998). TatRevM5 kann demnach die Expression von pSLIIBCAT nicht aktivieren. Exprimieren die Zellen dagegen auch wtRev, so kann das Wildtyp-Protein einerseits mit RevM5 (im Kontext des TatRevM5) oligomerisieren und andererseits an SLIIB binden. Durch die Bindung führt das Tat aus dem Fusionsprotein zu einer Aktivierung der CAT-Expression von pSLIIBCAT (Madore, S. J. et al., 1994).



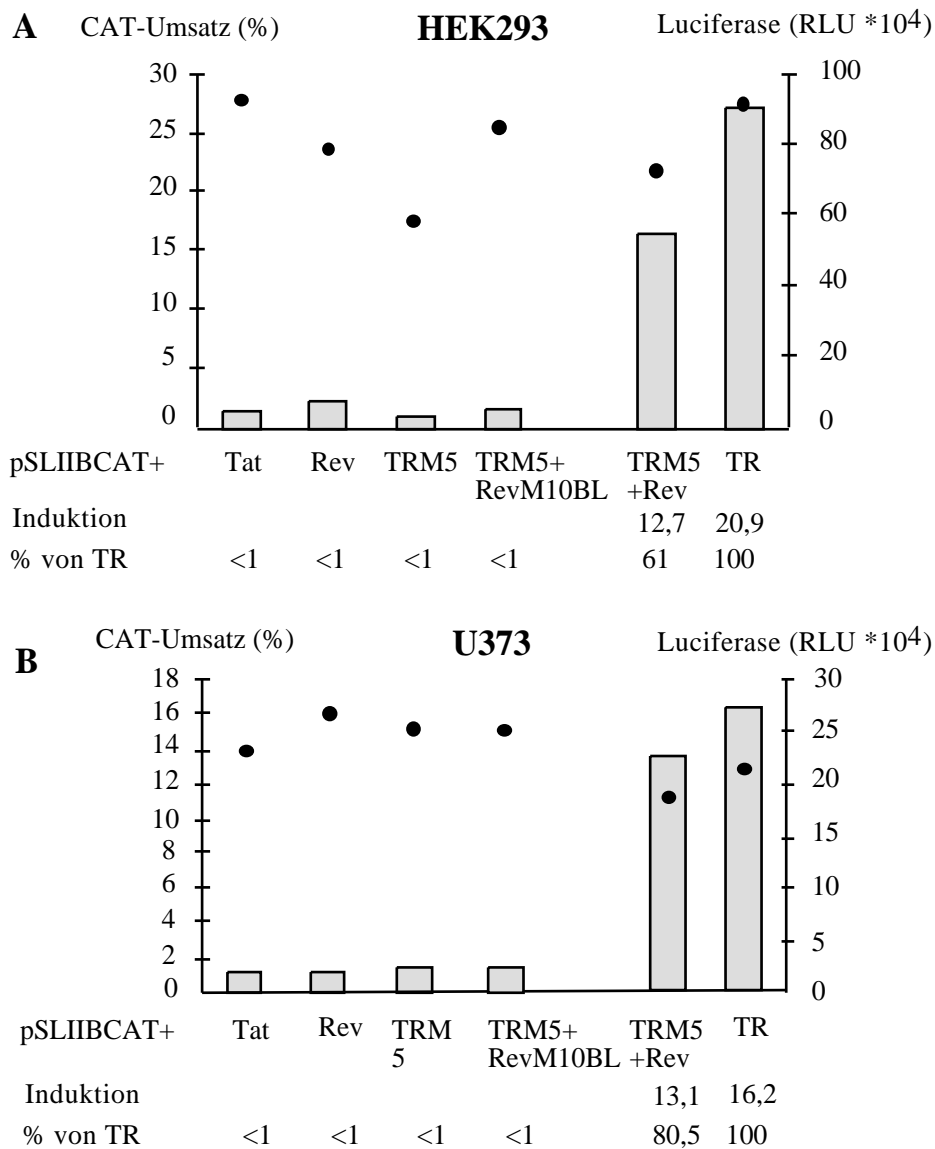
**Abb. 34:** Die Abbildung zeigt ein Schema des *in vivo* Oligomerisierungstests analog zum Bindungstest aus Abb. 20. wt – Wildtyp.

#### 3.6.2. Rev oligomerisiert in humanen Astrozyten

In Abbildung 35 ist beispielhaft je ein Einzelexperiment für die Kontrollzelllinie HEK293 (A) und die Astrozytomzelllinie U373 (B) dargestellt. Als Negativkontrollen dienen Kotransfektionen von pSLIIBCAT mit den Effektorplasmiden pcTat, pcRev und pcTatRevM5.



Alle Kontrollen wurden in jedem Experiment durchgeführt und waren negativ. Damit konnte sichergestellt werden, daß keines der verwendeten Plasmide alleine schon zu einer Aktivierung der CAT-Expression führen kann. In der Kontrolltransfektion mit pcTatRevM5 wurde bestätigt, daß RevM5 nicht in der Lage ist, die RNS zu binden.



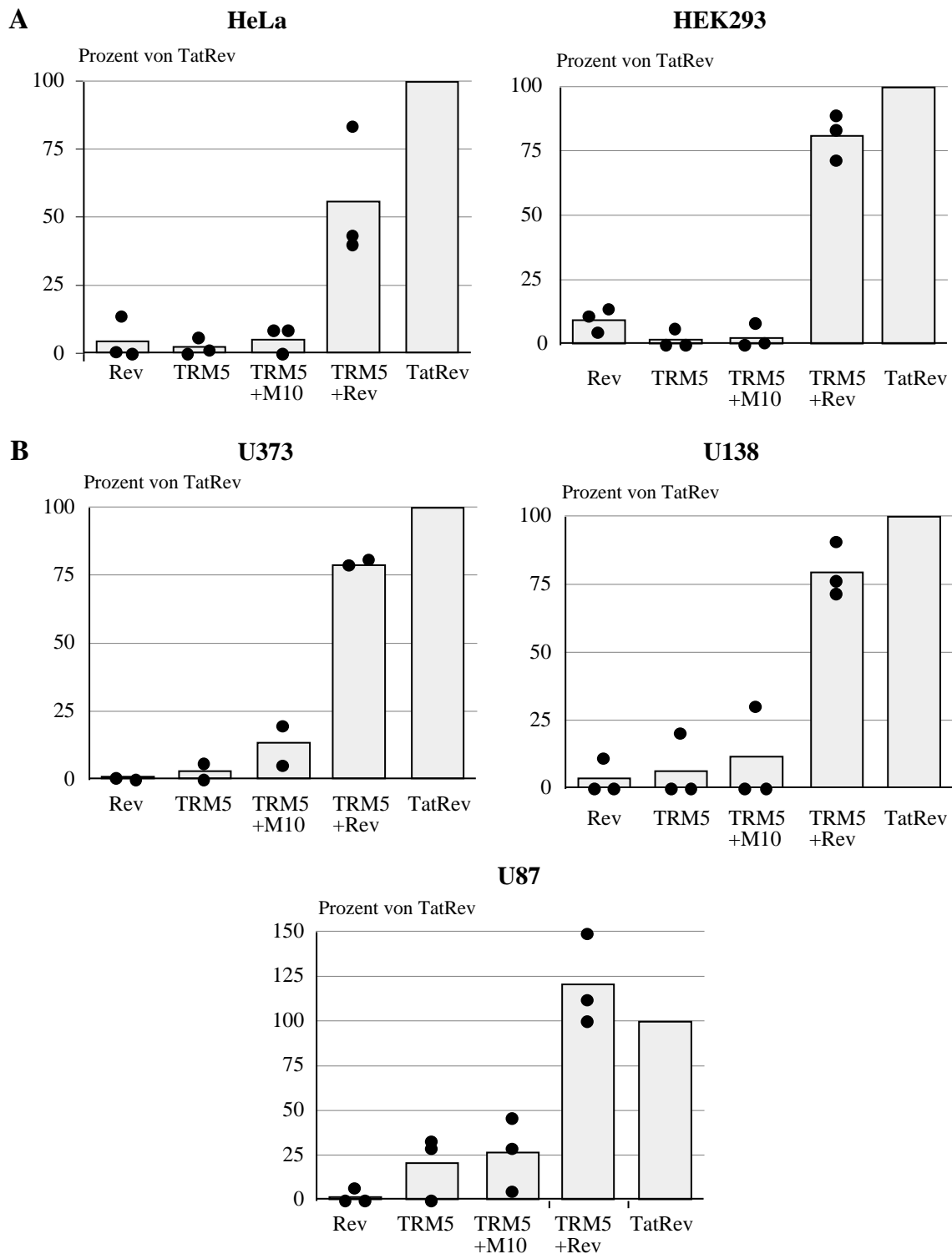
**Abb. 35:** Die Abbildung zeigt ein typisches Experiment zur Rev-Oligomerisierung. Dargestellt sind Daten für eine Kontrollzelllinie (HEK293, 35A) und eine Astrozytomzelllinie (U373, 35B) aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Säulen zeigen den CAT-Umsatz in Prozent, die Punkte die Luciferase-Messwerte. Es wurden jeweils 2 µg pSLIIBCAT und 1 µg Effektorplasmid(e) transfiziert. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmungen ausgeführt und der Mittelwert angezeigt. TR - TatRev. Mit <1 sind Experimente bezeichnet, in denen der CAT-Umsatz dem Basalwert entsprach.

Im Rahmen der Untersuchung der Rev/RNS-Bindung (Kap. 3.4.) wurde bereits die Mutante RevM10BL eingeführt. Die Mutationen in RevM10BL liegen nicht in der N-terminalen Bindungs- und Oligomerisierungsdomäne, sondern C-terminal im Bereich des Exportsignals (vgl. Abb. 4, S. 9). Daher war zu erwarten, daß das Oligomerisierungsverhalten nicht beeinträchtigt ist. Es zeigte sich jedoch, daß die Koexpression von RevM10BL mit TatRevM5 im Oligomerisierungstest nicht zu einer Aktivierung der CAT-Expression führte. Dieser Befund könnte eine Beteiligung der Aktivierungsdomäne an der Oligomerisierung bedeuten, wie es z. B. von Madore et al. vorgeschlagen wurde (Madore, S. J. et al., 1994). Madore et al. postulierten einen zellulären Faktor, der die beiden funktionellen Domänen verbindet. Ferner wäre denkbar, daß RevM10BL durch seine Akkumulation im Kern auch die RNS sequestriert und damit einen Transport aus dem Kern und eine Translation verhindert.

Dagegen führte Kotransfektion von pcTatRevM5 und pcRev zu einer deutlichen Expressionssteigerung gegenüber dem uninduzierten Wert um 12,7 in HEK293-Zellen und 13,1 in U373-Zellen. Die Induktion durch TatRev betrug für HEK293-Zellen 20,9 und für U373-Zellen 16,2.

Die Ergebnisse für die einzelnen Zelllinien sind in Abbildung 36 zusammengefaßt. Es wurden drei Astrozytomzelllinien (U373, U87 und U138) gegenüber den beiden Kontrollzelllinien HeLa und HEK293 getestet. Die Zelllinie 85HG66 wurde aufgrund der Ergebnisse im Bindungstest (Kap. 3.4.5.) in die Untersuchungen nicht mit einbezogen. Zur Darstellung in der Abbildung wurde zunächst die Basalaktivität aus dem Ansatz pSLIIBCAT + pcTat von den CAT-Umsätzen aller Messungen subtrahiert. Von den so berichtigten Umsatzraten wurde die Aktivierung durch pcTatRev (Bindungsansatz) gleich 100% gesetzt und die übrigen Messwerte in Prozent davon angegeben. Die Säulen bezeichnen Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen.

In jeder Zelllinie war eine Aktivierung der CAT-Expression im Oligomerisierungsansatz zu verzeichnen. Dabei war diese Aktivierung im Allgemeinen niedriger als im parallel transfizierten Bindungsansatz. Dieses Verhältnis entspricht der Erwartung, da an der Oligomerisierung mehr Einzelkomponenten beteiligt sind (zwei Effektorplasmide statt einem), und wurde bereits in der Literatur beschrieben. Madore et al. gaben die Aktivierung der CAT-Expression durch TatRevM5 und Rev in HeLa-Zellen mit 66% der Aktivierung durch TatRev an (Madore, S. J. et al., 1994).



**Abb. 36:** Der Oligomerisierungstest im Vergleich von zwei Kontrollzelllinien (A) zu drei Astrozytomzelllinien (B). Die Punkte bezeichnen unabhängige Transfektionen in Doppelbestimmungen, die Säulen den Mittelwert. Die Werte sind als Prozent des Bindungsansatzes pSLIIBCAT + pcTatRev angegeben. In jedem Ansatz wurden 2 µg pSLIIBCAT kotransfiziert. Die Werte wurden um den Basalwert aus dem Ansatz pSLIIBCAT+pcTat berichtigt. TR - TatRev.

Lediglich für die Zelllinie U87 wurde eine durchschnittliche Aktivierung 100% gemessen. Auffällig war, daß in dieser Zelllinie die CAT-Expression in jedem Ansatz, der pcTatRevM5 enthält, erhöht war. Die überdurchschnittliche CAT-Expression im Oligomerisierungsansatz könnte somit auf eine höhere Basalaktivität von TatRevM5 an pSLIIBCAT in dieser Zelllinie zurückzuführen sein. Ob die erhöhte Aktivität durch eine schwache Bindung von RevM5 an SLIIB in diesem zellulären Kontext bedingt ist, kann aus diesem Ansatz nicht geschlossen werden. Eine TAR-unabhängige Aktivierung, die insbesondere in dieser Zelllinie untersucht wurde (Niikura, M. et al., 1996), kann jedoch ausgeschlossen werden, da von den gezeigten Werten in jedem Experiment der Wert aus pSLIIBCAT + Tat bereits subtrahiert wurde.

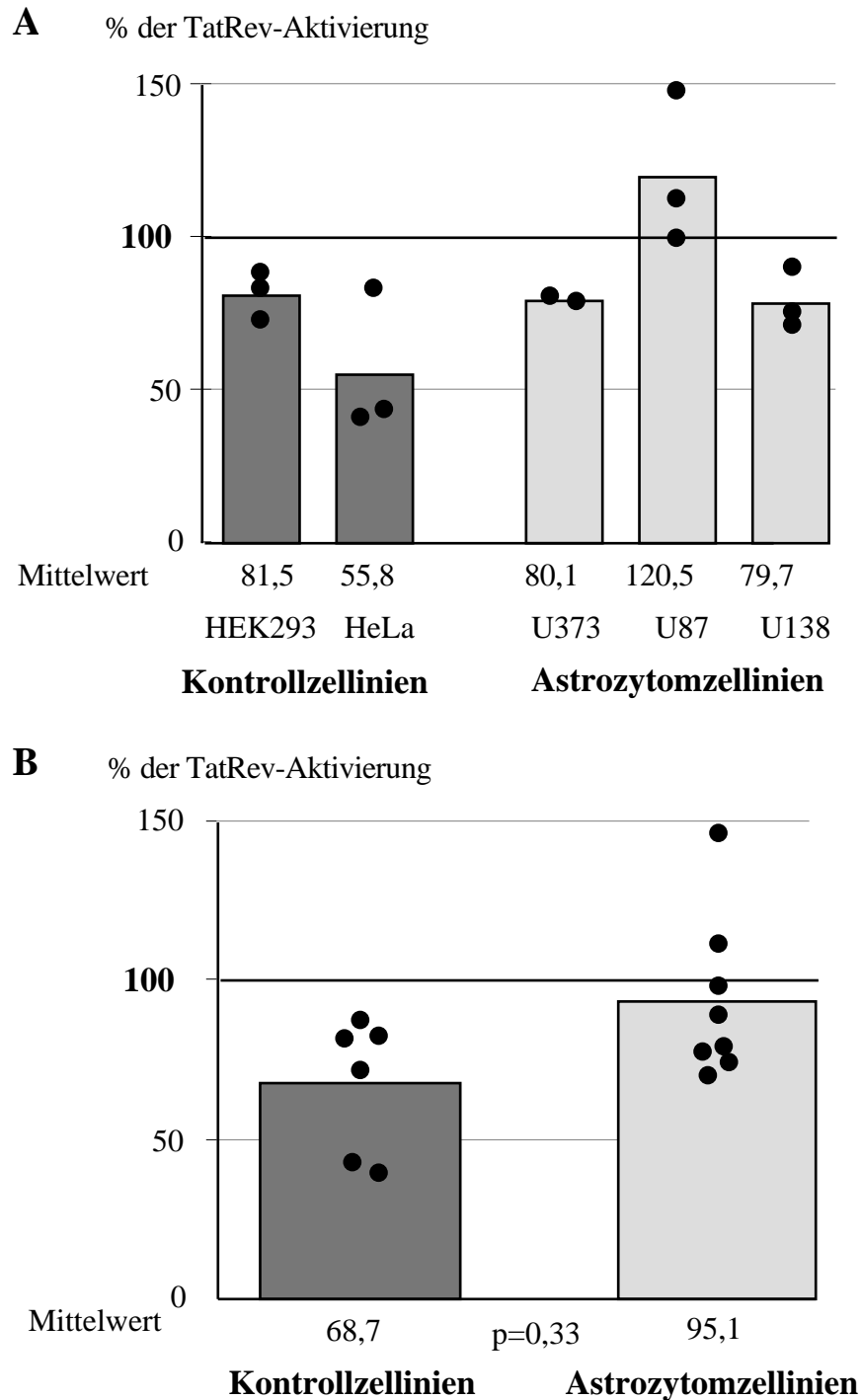
Wertet man die Daten statistisch aus, so ergibt sich für die U87-Werte (112,4; 148,9; 100,2) mit  $p = 0,024$  ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten. Berichtigt man allerdings die Werte aus dem Oligomerisierungstest in U87-Zellen um die TatRevM5-Basalaktivität anstelle der Tat-Basalaktivität, so beträgt der Mittelwert 100,5% und entspricht damit der Aktivierung im Bindungstest. Die Einzelwerte (71%, 115% und 116%) unterscheiden sich mit  $p = 0,26$  nicht signifikant von den Kontrollen.

Bewertet man die Ergebnisse aus den beiden Kontrollzelllinien HeLa und HEK293 statistisch zueinander, so ist mit  $p = 0,4$  ebenfalls kein signifikanter Unterschied festzustellen. Die dennoch geringeren Werte in HeLa-Zellen könnten auf eine geringere Expression von pcRev in dieser Zelllinie zurückzuführen sein. Auch die Konkurrenzexperimente mit pcRev im Bindungsansatz unterlagen in HeLa-Zellen einer größeren Schwankung als in HEK293 (vgl. Abb. 30, S. 67, und die Ausführungen hierzu).

Die Aktivierung der CAT-Expression im Ansatz pSLIIBCAT + TatRevM5 + RevM10BL entsprach in jeder Zelllinie dem Hintergrund aus der uninduzierten Messung (vgl. zum Wert mit Rev bzw. TatRevM5). Lediglich für die Zelllinie U373 konnte in einem Experiment eine Erhöhung des Wertes um 19% beobachtet werden, die jedoch nicht als signifikant angesehen werden konnte, da es sich um einen Einzelfund handelte. In den Astrozytomzelllinien U138 und U87 korreliert der Wert mit der schon erwähnten höheren Basalaktivität durch TatRevM5 (die erhöhten Werte in U138-Zellen stammen aus derselben Transfektion).

In Abbildung 37A sind die Daten zur Oligomerisierung zusammengefaßt. Die CAT-Expression aufgrund der Rev-Oligomerisierung lag zwischen 56% und 120% der Aktivierung im Bindungsansatz. Nimmt man alle Werte für Kontrollzellen bzw. Astrozytomzellen zusammen wie in Abbildung 37B gezeigt, ergibt sich ein Mittel von 68,7% gegenüber 95,1%. Wertet man die Daten statistisch aus, ergibt sich mit  $p = 0,33$  kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ergebnisgruppen. Die Standardabweichung beträgt 21,55 für die Kontrollzellen und 25,6 für die Astrozyten.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die Oligomerisierung von Rev in humanen Astrozyten im Vergleich zu Kontrollzellen nicht beeinträchtigt ist.



**Abb. 37:** Die Oligomerisierung von Rev in verschiedenen Zelllinien. A zeigt die Daten aus den einzelnen Zelllinien. Die Punkte bezeichnen unabhängige Transfektionen, Säulen den Mittelwert daraus. Die Experimente wurden in Doppelansätzen durchgeführt. B faßt die Kontroll- und Astrozytomzelllinien zusammen. Die Aktivierung der CAT-Expression im Oligomerisierungstest ist auf die Aktivierung im Bindungsansatz bezogen, der gleich 100% gesetzt wurde.

## 4. DISKUSSION

Die Rev-Achse der HIV-Regulation ist essentiell für die Virusreplikation. Unsere Arbeitsgruppe konnte in den vergangenen Jahren zeigen, daß die Rev-Funktion in Astrozyten erheblich beeinträchtigt ist, was zu einer nicht-produktiven Infektion dieser Zellen führt (Brack-Werner, R. et al., 1992) (Neumann, M. et al., 1995) (Ludwig, E. et al., 1999).

Die Transaktivierung der viralen Strukturproteinsynthese ist von einer Reihe von Einzelfunktionen des Rev-Proteins abhängig (eine Übersicht findet sich in Abb. 2, S. 5). Daraus ergab sich die Frage, ob die verminderte Rev-Transaktivierung in Astrozyten mit einem (oder mehreren) dieser Einzelschritte näher in Verbindung gebracht werden könnte. In den hier vorgestellten Untersuchungen wurden daher an der Rev-Regulation beteiligte Einzelschritte ausgekoppelt und ihre Funktionalität in Astrozyten mit der in Kontrollzellen verglichen. So wurde eingegrenzt, mit welcher der funktionellen Domänen von Rev eine Inhibition assoziiert sein bzw. in welchem Zellkompartiment sie stattfinden könnte. Es wurden von der N-terminalen Rev-Domäne vermittelte Funktionen untersucht (Abb. 4, S. 9)

Im Rahmen dieser Diskussion wird der Rev-Regulationszyklus unter Einbeziehung der Ergebnisse aus den vorliegenden Untersuchungen wieder aufgegriffen. Mit Hilfe der aktuellen Kenntnisse über die Rev-Regulation in Astrozyten wird ein Modell aufgestellt, das auch die noch nicht näher untersuchten Funktionen des Rev-Proteins einbezieht und einen Erklärungsansatz für die verminderte virale Replikation erlaubt.

Zunächst wurde die Rev-Transaktivierung in Astrozyten unter Verwendung eines heterologen (nicht HIV-abgeleiteten) Reportersystems untersucht, um einen möglichen Einfluß der HIV-Sequenzen selbst (in diesem Fall *gag* im Vergleich zu *env*) sowie einen möglichen Einfluß über die Translation verschiedener Transkripte zu betrachten.

### 4.1. Die Rev-Transaktivierung

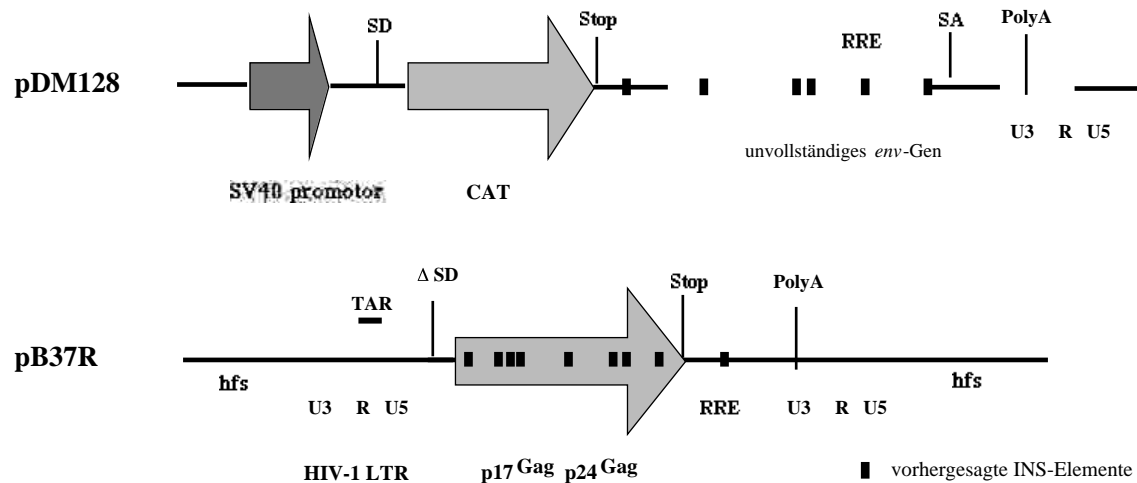
Die Rev-abhängige Expression des Reportergens *cat* in Astrozyten gegenüber Kontrollzellen wurde mit Hilfe des Reporterplasmides pDM128 untersucht. PDM128 enthält das *cat*-Gen unter der Kontrolle des SV40-Promotors, Teile des *env*-Gens einschließlich der RRE sowie einen HIV-Spleißdonor und -akzeptor. Die Rev-abhängige Stimulation der Expression des *cat*-Gens wurde in fünf Astrozytomzelllinien und zwei Kontrollzelllinien untersucht.

Dabei wurde eine um einen Faktor von etwa 5 verminderte Rev-abhängige Stimulation der CAT-Proteinsynthese in Astrozyten gegenüber Kontrollzellen festgestellt. Auffällig war, daß die Rev-unabhängige Expression des *cat*-Gens in Astrozyten im Gegensatz zu Kontrollzellen höher war und mit der Menge an Reporterplasmid stieg (vgl. die CAT-Expression in Abwesenheit von Rev im Vergleich von U373- und Hela-Zellen in Abb. 9, S. 30).

Die Funktion des zweiten viralen, RNS-bindenden Transaktivators, Tat, ist dagegen in allen getesteten Astrozytomzelllinien uneingeschränkt (Kap. 3.3.).

Unter Verwendung eines ähnlichen Plasmidsystems, in dem die Rev-Transaktivierung anhand der Expression des HIV-Strukturproteins p24<sup>Gag</sup> im Reporterplasmid pB37R gemessen wurde, wurde bereits eine 10fach verminderte Funktion von Rev in Astrozyten beschrieben (Ludwig, E. et al., 1999). Um diesen Unterschied von 5- zu 10fach näher zu erläutern, werden die Systeme im folgenden kurz gegenübergestellt.

Die Abbildung 38 zeigt einen Vergleich der Reporterplasmide pDM128 und pB37R. Die Tabelle weist auf die wesentlichen strukturellen Unterschiede der Plasmide hin.



	Promotor	HIV-Sequenzen	Abhängigkeit vom Spleißen	Reportergen
<b>pDM128</b>	SV40	partiell env mit RRE, 3'-LTR	ja	CAT
<b>pB37R</b>	HIV-LTR	p37Gag, RRE, 5'+3'-LTR	nein	p24Gag

**Abb. 38:** Ein Vergleich des Aufbaus der beiden Reporterplasmide zur Bestimmung der Rev-Transaktivierung. SD - Spleißdonor, SA – Spleißakzeptor, RRE – rev responsive element, TAR – Trans-activating response element, hfs – human flanking sequences, INS – inhibitory sequence.

### Der Promotor

Über die Bindung von zellspezifischen Transkriptionsfaktoren an den Promotor wird die Menge der entstehenden mRNA reguliert. Dieser Vorgang hat jedoch keinen Einfluß auf die Expression der mRNA. In der Literatur finden sich keine Hinweise, daß der SV40-Promotor spezifisch in Astrozyten besonders stark transkribiert würde, was eventuell die hohe Rev-unabhängige CAT-Expression in diesen Zellen erklären könnte. Maldarelli et al. beschrieben bei der Untersuchung inhibitorischer Sequenzen (INS, vgl. auch im folgenden Abschnitt) in verschiedenen Reporterensystemen keinen Unterschied der Reporterexpression unter Verwendung des CMV-Promotors oder des HIV-LTR-Promotors (Maldarelli, F. et al., 1991). Es ist also nicht anzunehmen, daß die Promotorsequenzen per se einen Einfluß auf die Rev-abhängige Regulation haben.

### Die HIV-abgeleiteten Sequenzen

Das Reporterplasmid pDM128 enthält große Teile der *env*-Region einschließlich der RRE, wohingegen pB37R *gag*-Sequenzen und die RRE beinhaltet. Eine Reihe von Studien beschäftigte sich mit dem Einfluß der HIV-Sequenzen auf die Transaktivierung durch Rev. In den *gag*-, *pol*-, *env*- und *vif*-kodierenden Bereichen wurden Nukleotidsequenzen identifiziert, die in der Lage sind, die Expression der RNS in der Abwesenheit von Rev zu inhibieren (Schwartz, S. et al., 1992) (Nasioulas, G. et al., 1994) (Reddy, T. R. et al., 1995). Die Mutation dieser Sequenzen führte zu einer Rev-unabhängigen Expression (Schneider, R. et al., 1997). Dabei handelt es sich um als INS (inhibitory sequences) oder CRS (cis-acting repressor sequences) bezeichnete kurze Nukleotidfolgen. Sie agieren als „Gegenspieler“ der Rev-Funktion, so daß die RNS im Zellkern entweder gespleißt oder degradiert wird (Dayton, A. I., 1996). Rev seinerseits kann die INS-vermittelte Retention der RNS im Zellkern überwinden.

Es konnte gezeigt werden, daß in der Abwesenheit von Rev *gag*- und *env*-RNS in bestimmten Bereichen des Zellkerns sequestriert wird, möglicherweise in Assoziation mit der Kernmatrix, während Rev-unabhängige RNS in Assoziation mit Komponenten des Spleißapparates in sog. „nuclear speckles“ vorliegt (Seguin, B. et al., 1998) (Berthold, E. und Maldarelli, F., 1996). Die Interaktion der INS-Elemente mit zellulären Faktoren konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Sakai et al. beschrieben eine differentielle Rev-abhängige Regulation von HIV-mRNS unabhängig von *gag*- oder *env*-Sequenzen; die Modulation wurde auf einen Einfluß der Spleißstellen selber zurückgeführt (Sakai, H. et al., 1995). Borg et al. bezeichneten Spleißstellen als CRS und beschrieben die inhibitorische Wirkung einer kryptischen Spleißstelle (Borg, K. T. et al., 1999). Mikaélian et al. beschrieben, daß eine heterologe ( $\beta$ -Globin) mRNA, die die RRE enthält, erst durch eine zusätzlich eingefügte INS effizient Rev-abhängig reguliert wird; durch die Mutation einer Spleißstelle wird die Expression wieder Rev-unabhängig (Mikaelian, I. et al., 1996).

Trotz dieser zum Teil noch kontroversen Diskussion über die Natur inhibitorischer Sequenzen wird deutlich, daß die Rev-Regulation wesentlich durch das Zusammenspiel mit zellulären Faktoren im Zellkern geprägt ist. Deshalb erscheint es plausibel, daß aufgrund unterschiedlicher HIV-Sequenzen in Reporterplasmiden eine unterschiedliche Rev-Transaktivierung feststellbar war. Eine Reihe von INS-Elementen der *gag*- und *env*-Sequenzen sind in Abbildung 38 eingezeichnet. Sie wurden für *env* durch Computeranalysen prognostiziert, für *gag* liegen darüber hinaus experimentelle Daten vor (Dr. Ralf Schneider, GSF, Neuherberg, persönliche Mitteilung). Es wurde eine stringentere Rev-Regulation in der Gegenwart von *gag*-Sequenzen im Vergleich zu *env* beschrieben (Sakai, H. et al., 1995). Abbildung 38 verdeutlicht, daß mehr potentielle INS-Elemente in *gag* als in *env* enthalten sind.

Faßt man diese Daten zusammen, ist ein Unterschied in der Rev-abhängigen Regulation von 5fach in pDM128 und 10fach in pB37R durchaus zu erklären. Allerdings erscheint insbesondere aufgrund der höheren Rev-unabhängigen Expression in Astrozyten das pDM128-System weniger geeignet zur Untersuchung regulatorischer Vorgänge in diesen Zellen. Die spezifisch in Astrozyten erhöhte Rev-Unabhängigkeit mag mit einer nicht effizienten Erkennung der Spleißstellen oder einer möglichen Interaktion von INS-Elementen mit Astrozyten-spezifischen



Faktoren zusammenhängen. Zellspezifisches alternatives Spleißen ist ein gutes Beispiel für die differentielle Regulation zellulärer Gene (zusammengefaßt in (Lopez, A. J., 1998)). Erst kürzlich wurde die differentielle Expression einer mRNA in Astrozyten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und Alter der Zellen beschrieben (Cai, Z. et al., 2000).

Um eine mögliche zellspezifische Regulation über die INS-Elemente oder das Spleißen zu untersuchen, wäre z. B. ein Austausch der *env*-Sequenzen aus pDM128 gegen *gag*-Sequenzen aus pB37R oder ein schrittweiser Austausch der Spleißstellen in pDM128 sinnvoll.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß mit beiden Plasmidsystemen eine signifikante Verminderung der Rev-abhängigen Expression eines Reportergens in Astrozyten gegenüber Kontrollzellen zu verzeichnen ist. Es konnte ausgeschlossen werden, daß die verminderte Rev-Transaktivierung in Astrozyten nur auf einen spezifischen Einfluß der *gag*-Sequenzen selbst zurückzuführen ist.

### *Das Reportergen*

Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Daten fanden Gorry et al. unter Verwendung von pDM128, daß die Rev-Transaktivierung in der Astrozytomzelllinie U251 im Vergleich zu HeLa-Kontrollzellen nicht vermindert ist (Gorry, P. R. et al., 1999). Die Autoren führten die verminderte Strukturproteinsynthese von HIV in Astrozyten auf einen spezifischen Block in der *gag*-mRNA-Translation zurück, nicht jedoch auf eine verminderte Rev-Funktion. Diese Daten konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Gorry et al. verglichen die beiden Zelllinien anhand der Rohdaten (in Prozent CAT-Umsatz), die sie um den CAT-Umsatz im Ansatz ohne Rev berichtigten. Auch in diesen Studien war die Basalexpression in Astrozyten höher als in Kontrollzellen. Aufgrund der Schwierigkeit, Faktoren wie Expressionsaktivität verschiedener Promotoren, Transfektionseffizienz oder auch Geschwindigkeit des mRNA-Abbaus in verschiedenen Zelllinien zu vergleichen und zu standardisieren, darf jedoch bezweifelt werden, daß die Rohdaten einen verlässlichen Maßstab darstellen. Als Beispiel seien die Werte der Transfektionsansätze mit 1 µg pDM128 aus Tabelle 1 (S. 30) genannt. Der CAT-Umsatz für U373-Zellen ist nach Subtraktion des Wertes ohne Rev mit 10,5% höher als in HeLa-Zellen (6,5%) bei vergleichbaren Luciferase-Werten. Die Rev-abhängige Stimulation der CAT-Expression betrug für HeLa-Zellen 7,5, für U373-Zellen dagegen nur 1,9. Diese Beobachtung verdeutlicht die Notwendigkeit, Zelllinien mittels einer relativen Größe wie der Induktion zu vergleichen.

Darüber hinaus verwendeten Gorry et al. die Astrozytomzelllinie U251, von der in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, daß sie mit steigender Passagenzahl die Rev-Transaktivierung verstärkt unterstützt (Eva Ludwig, GSF, persönliche Mitteilung).

Die in dieser Arbeit dargestellten Experimente konnten zeigen, daß die verminderte Rev-Transaktivierung in Astrozyten unabhängig vom verwendeten Reportergen ist und somit die Inhibition der Rev-Transaktivierung vermutlich zu einem früheren Zeitpunkt als der Translation geschieht. Durch die Untersuchung von fünf verschiedenen Astrozytomzelllinien konnte sichergestellt werden, daß die signifikant verminderte Rev-Funktion eine allgemeine Eigenschaft von Astrozyten ist.

## 4.2. Die Bindung von Rev an die RNS

### 4.2.1. Ein *in vivo*-System

Zur Untersuchung der Bindung von Rev an seine Ziel-RNS wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vivo* System basierend auf transienten Transfektionen verwendet. Aufgrund der Bindung von Rev an seine Zielsequenz SLIIB und nachfolgender Transaktivierung des LTR durch Tat in einem TatRev-Fusionsprotein wird die Expression des Reportergens *cat* stimuliert (Abb. 20, S. 45). Das System ermöglicht es, die Bindung selektiv zu analysieren, ohne daß - wie beispielsweise durch die Einführung von Mutationen in Rev - auch die mit der Bindungsdomäne überlappende Kernimport-Domäne beeinträchtigt wird. Die Vor- und Nachteile des Systems werden im folgenden kurz diskutiert.

Das „Modell der kooperativen Rev-Bindung“ legt zugrunde, daß zunächst ein Rev-Monomer an SLIIB bindet, wodurch die Bindung weiterer Rev-Moleküle an die RNS erleichtert wird; die Bereiche der RRE außerhalb von SLIIB werden als sekundäre Bindestellen bezeichnet (vgl. Kap. 1.1.2.2.2.). Verschiedene Arbeitsgruppen bestätigten, daß die initiale Bindung durch ein Rev-Monomer stattfindet (Tiley, L. S. et al., 1992) (Kjems, J. et al., 1992) (Charpentier, B. et al., 1997). Cole et al. beschrieben, daß bei geringen Rev-Konzentrationen ein Monomer die RRE bindet und die Oligomerisierung konzentrationsabhängig stattfindet, aber keine Voraussetzung für die Bindung ist (Cole, J. L. et al., 1993). Darüber hinaus beschrieben Madore et al., daß die Oligomerisierungs-defekte Mutante RevM4 im auch in dieser Arbeit verwendeten Bindungstest sogar eine höhere CAT-Expression zur Folge hatte als wtRev (Madore, S. J. et al., 1994). Es kann also davon ausgegangen werden, daß insbesondere für die Bindung an SLIIB ein Rev-Monomer ausreichend und eine Oligomerisierung nicht erforderlich ist. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch Rev-Oligomere an SLIIB binden können.

Auch der Transport der RNS ist im gezeigten System unabhängig von der Rev-Regulation. Dies wird aus der Studie von Madore et al. deutlich. Die Rev-Mutante M10 akkumuliert im Kern und ist nicht mehr in der Lage, den Transport Rev-abhängiger RNS zu vermitteln. Trotzdem konnte ihre Bindungskapazität *in vivo* gezeigt werden. Der Transportweg der RNS ist in diesem System demnach nicht CRM1-abhängig (Kap. 1.1.2.2.2.). Der Test ist daher geeignet, die Bindung von Rev an RNS im Zellkern selektiv zu betrachten.

Des weiteren eröffnet sich im *in vivo* Test die Möglichkeit, die Bindung von Rev in verschiedenen Zelllinien unter Einfluß der jeweiligen zellspezifischen Faktoren zu betrachten. In einem *in vitro* Ansatz zur Untersuchung der Protein/RNS-Wechselwirkung wie beispielsweise der „gel-shift“ Analyse (Malim, M. H. et al., 1990) (Brice, P. C. et al., 1999) bleibt dagegen der Einfluß zellulärer Faktoren unberücksichtigt, d. h. verschiedene Zelllinien können nicht verglichen werden. Unspezifische Wechselwirkungen, z. B. aufgrund der Verwendung von in Bakterien hergestelltem rekombinanten Protein, sind schwer zu erkennen und zu interpretieren. Bakterien unterstützen keine posttranslationalen Modifikationen eukaryotischer Proteine wie z. B. Phosphorylierungen oder Modifikationen, die ein Protein in ein bestimmtes Zellkompartiment leiten.

Allerdings bietet der *in vivo*-Ansatz per se keine Möglichkeit, die Bindungsstärke in verschiedenen Zelllinien vergleichend zu quantifizieren. Einflußfaktoren in lebenden Zellen wie die Transfektionseffizienz und die Stabilität des CAT-Proteins oder der RNS in verschiedenen Zelllinien sind schwer zu untersuchen und zu standardisieren. Diese Problematik zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in Kapitel 3.4.5. bei der Untersuchung des Bindungsverhaltens in 85HG66-Zellen und soll später noch diskutiert werden.

#### **4.2.2. *Rev bindet in humanen Astrozyten effizient an seine Ziel-RNS***

Es konnte festgestellt werden, daß die Bindungskapazität von Rev an seine Ziel-RNS SLIIB in Astrozytomzelllinien gegenüber Kontrollzelllinien nicht vermindert ist. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Zelllinien festgestellt. Auffällig ist die Variabilität der Induktionen, die zwischen etwa 10 und 30 liegen. Allerdings sind die Standardabweichungen für Astrozyten und Kontrollzellen mit 6,4 und 6,0 nahezu identisch. Die Streuung der Einzelwerte ist somit auf die „natürliche Variabilität“ des Testsystems in lebenden Zellen zurückzuführen. Mit größerer Anzahl an Einzelwerten, die in diesem Kontext wichtig ist, nähern sich die beiden Ergebnisgruppen einem gemeinsamen Mittelwert. Dasselbe gilt für die Tat-Transaktivierungen aus Kapitel 3.3.1.; die Induktionen schwanken zwischen 5 und 25, die Standardabweichung für Astrozyten beträgt 4 und für Kontrollzellen 6.

Auch die Lokalisation des Fusionsproteins TatRev ist in Astrozyten und Kontrollzelllinien identisch. Die verstärkte zytoplasmatische Lokalisation von Rev in Astrozyten ist möglicherweise auf eine verminderte Kernimportrate zurückzuführen (vgl. Kap. 1.1.2.2.2.). Eine Ursache hierfür könnte eine ineffiziente Erkennung der Rev-NLS durch Importin  $\beta$  darstellen (Kap. 1.1.2.2.2.), die möglicherweise reversibel ist und durch die Einführung einer zweiten NLS (wie hier von Tat) aufgehoben werden könnte. Dies konnte nicht bestätigt werden, TatRev lokalisiert in Astrozyten ebenso wie Rev. Allerdings ist das Fusionsprotein auch in Kontrollzellen zytoplasmatisch akkumuliert, obwohl Tat und Rev einzeln kernlokalisiert sind. Daher ist anzunehmen, daß die Ursache für die zytoplasmatische Rev-Lokalisation in Astrozyten nicht dieselbe ist, die in diesen Zellen zur zytoplasmatischen Lokalisation von TatRev führt. Möglicherweise werden die Importsignale aus Tat und Rev durch die Faltung des Fusionsproteins maskiert und dadurch schwächer.

Die dargestellten Experimente konnten zeigen, daß die Rev-Bindungsdomäne auch im zellulären Kontext der Astrozyten funktionell ist und eine verminderte RNS-Bindung durch Rev nicht die Ursache für die verminderte Rev-Funktion in Astrozyten ist.

##### **4.2.2.1. *Die Bindung von Rev an SLIIB in der humanen Astrozytomzelllinie 85HG66***

Die Zelllinie 85HG66 stellte einen Sonderfall dar. Es war nicht möglich, die Ergebnisse eindeutig zu interpretieren. Um möglichst viele Einflußfaktoren, die neben mangelnder Bindung

für eine geringe CAT-Expression verantwortlich sein könnten, auszuschließen, wurden die im folgenden zusammengefaßten Parameter getestet (vgl. Tab. 4, S. 56).

### *Methodische Einflußfaktoren*

#### *Die Plasmide*

Durch häufiges Einfrieren und Auftauen können Plasmide einen hohen Anteil superspiralisierter DNS ausbilden oder sich Einzelstrangbrüche ereignen, in deren Folge die Plasmide sich nicht mehr transfizieren lassen bzw. nicht mehr exprimiert werden. Daher wurden im Verlauf der Experimente mehrmals neue Plasmide präpariert.

#### *Die Transfektionseffizienz*

Bei einer Transfektion nach der CaPO<sub>4</sub>-Methode werden nur etwa 10% der 85HG66-Zellen transfiziert (Abb. 7, S. 24). Um auszuschließen, daß die Reporterogenaktivität unter der Nachweisgrenze lag, wurde die Expression des unabhängigen Reportergens *luciferase* in jedem Einzelansatz nachgewiesen. In ausgewählten Ansätzen wurde die Expression von GFP visualisiert. In einem parallelen Ansatz wurde die Stimulation der CAT-Expression an der HIV-LTR durch Tat bestimmt.

Auch die Verwendung einer weiteren Transfektionsmethode (Kap. 6.2.1.4.2.) konnte die Effizienz nicht erhöhen. Um die Transfektionsgemische des Bindungsansatzes zu prüfen, wurden für beide Transfektionsmethoden in ausgewählten Experimenten andere Zelllinien mit demselben Plasmidmix parallel transfiziert. Parallel transfizierte Zelllinien waren bezüglich aller getesteter Reporterogenaktivitäten einschließlich der CAT-Expression im Bindungstest immer positiv.

Es konnte daher ausgeschlossen werden, daß die Reporterogenaktivität aufgrund methodischer Einflußfaktoren in 85HG66-Zellen unter der Nachweisgrenze lag.

### *Zellspezifische Einflußfaktoren*

#### *Die Expression des Effektorplasmides*

Ein möglicher Grund für eine mangelnde CAT-Expression im Bindungstest ist keine oder eine nur schwache Expression von TatRev. Um dies auszuschließen, wurde TatRev sowohl als Fusionsprotein mit GFP als auch in der indirekten Immunfluoreszenz auf Einzelzellebene nachgewiesen (Kap. 6.2.4.3. und 6.2.3.5.). Darüber hinaus wurde die Menge an pcTatRev für 85HG66-Zellen und HeLa-Kontrollzellen sowohl für pSLIIBCAT als auch für pHIV npsLTRCAT parallel titriert. TatRev zeigte an der HIV-LTR in HeLa- und 85HG66-Zellen eine vergleichbare Transaktivierung der CAT-Expression. Damit konnte bestätigt werden, daß TatRev in 85HG66-Zellen exprimiert wird und funktionell ist. Dagegen war die CAT-Expression mit pSLIIBCAT in 85HG66-Zellen deutlich niedriger als in HeLa-Zellen. Eine Erhöhung der TatRev-Menge führte in 85HG66-Zellen nicht zu einer dosisabhängigen Erhöhung der CAT-Expression im Bindungsansatz.

#### *Die Zellpassage*

Im Verlauf der Experimente zur Bindung von Rev an SLIIB in 85HG66-Zellen wurden drei verschiedene Zellpassagen verwendet. In Zellen der Passage p+x war Rev nicht in der Lage, an

SLIIB zu binden. Unter Verwendung der Passagen p6+x und p6+3+x konnte jedoch eine Stimulation der CAT-Expression verzeichnet werden (zur Nomenklatur der Zellpassagen vgl. Kap. 6.2.1.1.). Ein spezifischer inhibitorischer Einfluß der Passage p+x kann daher nicht ausgeschlossen werden. Wie bereits mehrmals angesprochen wurde (Kap. 6.2.1.), können Zelllinien in Kultur mit der Zeit ihr Expressionsmuster verändern.

In weiteren Experimenten in 85HG66-Zellen war eine Stimulation der CAT-Expression zu verzeichnen (Abb. 26, S. 59). Allerdings waren die Basalaktivitäten im Ansatz ohne TatRev so gering (<1% Umsatz), daß keine Induktionen berechnet werden konnten; dagegen waren die Luciferase-Werte in diesen Ansätzen mit denen in Hela-Kontrollzellen zu vergleichen. Wird dagegen die CAT-Expression im Bindungstest in Bezug zur CAT-Expression aus der Tat-Transaktivierung gestellt, ergibt sich indirekt die Möglichkeit zur Quantifizierung der Bindung (Kap. 3.4.4.). In 85HG66 betrug die CAT-Expression im Bindungstest nur 23% der CAT-Expression durch die Tat-Transaktivierung, während das Mittel der übrigen Zelllinien reproduzierbar bei 65% lag (Tab. 3). Diese Beobachtung, zusammen mit den oben aufgelisteten ausführlichen Kontrollen zur Transfektionseffizienz und zur TatRev-Expression, legten den Schluß nahe, daß die Rev/SLIIB-Bindung in 85HG66-Zellen deutlich schwächer ist als in den übrigen getesteten Zelllinien.

Allerdings fällt auf, daß die Luciferase-Werte in 85HG66-Zellen in Transfektionen mit pSLIIBCAT und steigenden Mengen pcTatRev signifikant sinken. Dies wurde weder in entsprechenden Transfektionen mit pHIV npsCAT noch in Kontrollzellen beobachtet (Abb. 26, S. 59). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß pSLIIBCAT oder pSLIIBCAT zusammen mit pcTatRev einen spezifischen toxischen Einfluß auf 85HG66-Zellen hat. Trotz der deutlichen Hinweise auf eine eingeschränkte Bindungskapazität von Rev an SLIIB in dieser Zelllinie kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß das Bindungssystem für die Analyse in 85HG66-Astrozytomzellen geeignet ist.

Die Bindungskapazität von Rev sollte daher in einem zweiten System verifiziert werden, das eine genaue Quantifizierung ermöglicht. Denkbar wäre beispielsweise, einen Zellextrakt mit *in vitro* transkribierter, markierter RRE und einer definierten Menge an rekombinantem Rev zu versetzen und die Bindung zu erlauben. Nach einer Immunpräzipitation mit einem Rev-spezifischen Antikörper, dessen Bindung nicht mit der RNS-Bindestelle interagiert, sollte es möglich sein, die Menge an präzipitierter RNS relativ zur Menge an verbleibender RNS im Ansatz zu quantifizieren. Durch die Verwendung einer definierten Menge an RNS und Rev wäre der Positiv-Vergleich zu einer Zelllinie möglich, die die Rev-Funktion unterstützt. Als Negativkontrolle wäre ein Ansatz mit einer Bindungs-defekten Mutante wie RevM5 denkbar. Diese Kontrolle könnte auch den Basalwert als Grundlage für eine Quantifizierung liefern.

Interessant ist darüber hinaus auch der Vergleich zu der 85HG66-Passage, die die Bindung nicht unterstützte. Möglicherweise wurde hier im Verlaufe der Zellkultur unter bestimmten Bedingungen auf die Expression eines inhibitorischen Faktors selektioniert. Ein spezifischer, in eukaryotischen Zellen natürlich vorkommender Faktor, der die Rev/RNS-Bindung inhibiert, wäre im Hinblick auf die HIV-Therapie sehr interessant.

#### 4.2.2.2. *Die Hemmung der Bindung durch verschiedene Kompetitoren*

Die Spezifität der Rev/RNS-Bindung konnte in Konkurrenzexperimenten mit Protein-Kompetitoren bestätigt werden. Dabei waren unterschiedliche Mengen der verschiedenen Kompetitoren notwendig, um eine vergleichbare Inhibition zu erreichen. Diese Beobachtung reflektiert spezifische Charakteristika dieser Kompetitoren, die im folgenden für Astrozyten und Kontrollzellen verglichen werden. Unterschiedliche Eigenschaften von Mutanten in Astrozyten im Vergleich zu Kontrollzellen könnten darauf hindeuten, daß eine für die verminderte Rev-Funktion in Astrozyten bedeutende funktionelle Domäne mutiert wurde.

#### *RevM10BL*

Es konnte gezeigt werden, daß RevM10BL die Bindung Rev/SLIIB dosisabhängig und effizient inhibiert. Dabei ist ein molares Verhältnis von pBsRevM10BL zu pcTatRev von etwa 1:3 ausreichend, um die CAT-Expression um die Hälfte zu reduzieren (Tab. 6).

RevM10BL ist eine Kernexport-defekte Mutante mit einem transdominant negativen Phänotyp (Kap. 1.1.2.2.2.). Daraus ergeben sich eine Reihe von Einflußfaktoren, die bei der Inhibition der Bindung von Bedeutung sind. RevM10BL akkumuliert im Zellkern, wodurch sich die Verfügbarkeit am Ort der RNS-Bindung erhöht. PBsRevM10BL enthält den HIV-LTR-Promotor, der durch Tat transaktiviert wird. Es besteht also eine zusätzliche Konkurrenz um Tat aus TatRev, da kein zusätzliches Tat exprimiert wird. Es konnte allerdings bestätigt werden, daß schon sehr geringe Mengen Tat ausreichend zur Aktivierung der LTR sind (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus kann RevM10BL nicht nur ein Kompetitor um die RRE-Bindung direkt sein, sondern auch gleichzeitig vorhandenes Wildtyp-Rev inaktivieren. Eine große Anzahl von Studien beschäftigte sich mit dem Mechanismus der Transdominanz von NES-Mutanten (im weiteren zusammengefaßt als TDRRev); dennoch konnte er bisher nicht vollständig geklärt werden (Hamm, T. E. et al., 1999) (Stauber, R. H. et al., 1998) (Szilvay, A. M. et al., 1997) (Hope, T. J. et al., 1992). Da TDRRev die HIV-Replikation sehr effizient hemmt (Malim, M. H. et al., 1991), besitzt es auch im Rahmen der HIV-Therapie Bedeutung. Es wurden klinische Studien vorgestellt, in denen Patienten die RevM10-Sequenz in einem Gentransfer mit einem retroviralen Vektor gegeben wurde (Ranga, U. et al., 1998) (Woffendin, C. et al., 1996). Auch über einen Ansatz zur Gentherapie im ZNS unter Verwendung der RevM10-Sequenz wurde berichtet (Mukhtar, M. et al., 2000).

Als wesentliche Mechanismen für die Transdominanz werden die Bildung von inaktiven Hetero-Oligomeren (TDRRev/wtRev), die Konkurrenz um die Bindung der RRE und die Titration zellulärer Interaktionspartner diskutiert. Am häufigsten wurde die Bildung von inaktiven Hetero-Oligomeren als wesentlicher Faktor beschrieben (Szilvay, A. M. et al., 1995) (Stauber, R. et al., 1995) (Hope, T. J. et al., 1992). Dadurch wird der Export von Wildtyp-Rev (und damit auch der RNS) aus dem Zellkern verhindert (Szilvay, A. M. et al., 1995).

Aber auch eine Inhibition durch direkte Bindung von TDRRev an die RNS wurde diskutiert (Benko, D. M. et al., 1990). Kürzlich wurde über die Etablierung einer HIV-infizierten „TDRRev-resistenten“ Zelllinie berichtet, die aufgrund längerer Passagen im Beisein von TDRRev entstanden ist; sie trägt interessanterweise eine Mutation in der RRE (Hamm, T. E. et al., 1999).

Stauber et al. beschrieben, daß zytoplasmatische Rev-Mutanten keinen transdominant-negativen Phänotyp aufweisen und schließen daraus, daß die Bindung an die RNS wesentlich für die Transdominanz ist. Auch Bogerd et al. charakterisierten TDRRev-Mutanten, die nicht oligomerisieren (Bogerd, H. und Greene, W. C., 1993).

Es bleibt festzuhalten, daß Bindung und Oligomerisierung gleichermaßen am Mechanismus der Transdominanz beteiligt sein könnten oder sogar synergistisch wirken. Da jedoch im Gegensatz zur Oligomerisierung (Kap. 3.6.2.) die Bindung von RevM10 an SLIIB *in vivo* gezeigt werden konnte (Madore, S. J. et al., 1994), ist anzunehmen, daß in dem hier verwendeten System die Bindung den hauptsächlichsten Einfluß ausübt.

Kürzlich wurde beschrieben, daß der transdominante Effekt von Mutanten von HTLV-I Rex, einem in Funktion und Aufbau Rev-homologen viralen Protein, auf die Titration zellulärer Interaktionspartner wie Import- und Exportfaktoren zurückzuführen ist (Heger, P. et al., 1999). Die Autoren wiesen jedoch darauf hin, daß der Mechanismus der Rex-Funktion nicht wie die Rev-Funktion von einer Oligomerisierung abhängig und damit grundsätzlich unterschiedlich ist. Eine Titration von Exportfaktoren ist aufgrund der Mutation der NES als Mechanismus für die RevM10BL-Transdominanz unwahrscheinlich, da die Bindung an den Exportrezeptor CRM1 nicht mehr stattfindet (Bogerd, H. P. et al., 1998).

Zusammenfassend ist RevM10BL aufgrund verschiedener Einflußfaktoren ein effizienter Inhibitor im Rev/RNS-Bindungstest und bestätigt die Spezifität der Bindung. Es wurden keine Unterschiede im Kompetitionsmuster zwischen Astrozyten und Kontrollen festgestellt (Abb. 28, S. 64). Die Werte für eine 50%ige Hemmung der Bindung lagen für alle Zelllinien zwischen 0,29 und 0,31. Die Einzelwerte zeigten nur geringe Abweichung voneinander. Auch die Lokalisation von M10BL ist in allen Zelltypen identisch (Ludwig, E. et al., 1999). Es ergaben sich somit keine Hinweise, daß die NES-Region, beispielsweise durch die Bindung eines zellspezifischen Faktors in Astrozyten, an der Beeinträchtigung der Rev-Funktion in diesen Zellen beteiligt ist.

### Wildtyp-Rev

Auch Wildtyp-Rev konnte die CAT-Expression im Bindungstest in allen Zelllinien dosisabhängig inhibieren. Zum Vergleich der Ergebnisse mit verschiedenen Kompetitoren und Zelllinien sind die molaren Verhältnisse an Kompetitorplasmid zu pcTatRev, die zu einer Inhibition der CAT-Expression um 50% führten, in Tabelle 6 noch einmal zusammengefaßt.

	HeLa	HEK293	U138	U87
<b>RevM10BL</b>	0,32	0,29	0,32	0,3
<b>wtRev</b>	3,4 (1,8/5,1)	0,9 (0,5/0,6/2)	1,8	1,9
	0,9			
<b>wtRevGFP</b>	0,12	0,23	0,24	n.d.

**Tab. 6:** Die molaren Verhältnisse Kompetitorplasmid zu pcTatRev, die zu einer Inhibition der CAT-Expression im Bindungstest um 50% führten, für alle Zelllinien und Kompetitoren. Die Werte sind Mittelwerte der Experimente aus Kap. 3.5. In Klammern sind für ausgewählte Beispiele Einzelwerte gezeigt. Mit wtRev sind Kompetitionen mit dem Effektorplasmid pcRev bezeichnet. n.d. – nicht durchgeführt, wt – Wildtyp.

Für die Konkurrenz mit wtRev war insgesamt eine größere Menge Konkurrentorplasmid (pcRev) notwendig als für eine entsprechende Konkurrenz mit RevM10BL. Dies entsprach aufgrund der schon gezeigten Eigenschaften von RevM10BL (Transdominanz; Akkumulation im Kern; Expression durch den HIV-LTR) der Erwartung.

Die Werte für die Astrozytomzelllinien (1,8 und 1,9) ergaben sich aus Einzelwerten zwischen 1,6 und 2,2 und unterlagen damit keiner auffälligen Schwankung. Für die Zelllinie HEK293 war lediglich ein Wert mit 2,0 auffällig hoch, der Wert in HeLa-Zellen war dagegen mehr als 3fach höher, wobei die Einzelwerte stark voneinander abwichen. In einem gesonderten Experiment wurde dagegen ein Wert von 0,9 ermittelt.

Diese Konkurrenzexperimente sind wesentlich von der Expressionsstärke und Lokalisation des Konkurrentors relativ zur TatRev-Expression in den einzelnen Zelllinien abhängig. Schwankungen lassen sich daher durch Unterschiede der Transfektionseffizienz und Expressionsstärke der Plasmide in den einzelnen Zelllinien erklären. Wird eine verlangsamte Importrate von Rev in Astrozyten vorausgesetzt (Kap. 1.1.2.2.2. und 1.3.4.), ist der Import in diesen Zellen womöglich der zentrale Schritt der Rev-Regulation. Die Anzahl der Rev-Moleküle, die über einen bestimmten Zeitraum in den Zellkern gelangen, wäre dann nahezu konstant. Über die transportierte Menge hinaus exprimiertes Rev wird im Zytoplasma sequestriert und steht für eine Konkurrenz nicht zur Verfügung. Dies kann die geringe Schwankung der Werte aus Tabelle 6 in Astrozyten gegenüber den Kontrollen erklären.

PCsRevGFP exprimiert ein Fusionsprotein aus Rev und GFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Schon bei einem molaren Verhältnis von pCsRevGFP zu pcTatRev von etwa 1:5 wird die CAT-Expression zu 50% inhibiert. Aufgrund zweier Modifikationen im Vektor wird dieser besonders stark exprimiert (Kap. 3.5.2.). Offensichtlich lag auch bei geringen Plasmidmengen bereits ein hoher Überschuss an RevGFP zu TatRev vor. Da die Werte für alle Zelllinien sehr ähnlich sind, lag die Vermutung nahe, daß ein zusätzlicher Mechanismus ähnlich der Transdominanz von M10BL zum Tragen kam. Beispielsweise könnte TatRev durch Oligomerisierung mit RevGFP sequestriert werden und so nicht mehr zur Bindung von SLIIB zur Verfügung stehen.

Abbildung 39 zeigt einen Sequenzvergleich von HXB-3 Rev (pcRev, pcTatRev) und HXB-2 Rev (pCsRevGFP). HXB-2 Rev besitzt an Aminosäureposition 3 und 4 eine Insertion von 2 Aminosäuren und zwischen Position 13 und 17 vier Aminosäureaustausche. In Mutationsstudien wurde gezeigt, daß die Aminosäuren 13 bis 15 von HXB-3 für die Oligomerisierung essentiell sind (Thomas, S. L. et al., 1998). Die Unterschiede in der Sequenz von HXB-2 und HXB-3 Rev sind konservativer Natur; d. h. sie beeinträchtigen die Funktionalität nicht und stellen eine natürliche Varianz dar. Möglich wäre allerdings eine besonders starke Hetero-Oligomerisierung zwischen HXB-2 Rev und HXB-3 Rev, in deren Folge TatRev in den Zellen sequestriert wird (entweder im Zellkern oder im Zytoplasma) und so nicht mehr für eine RNS-Bindung zur Verfügung steht.

Spott et al. beschrieben am Beispiel des Lac-Repressors aus *E. coli*, daß die Veränderung schon einer Aminosäure Auswirkungen auf die Dimerisierung haben kann. Der Lac-Repressor dimerisiert aufgrund der Interaktion von 3  $\alpha$ -Helices in jedem Molekül. Der Austausch einer



Aminosäure hatte keinen Funktionsverlust zur Folge; die Mutanten dimerisierten miteinander, jedoch nicht mehr mit dem Wildtyp (Spott, S. et al., 2000).

		20		40		
MA--GRSGDS	DEDLLKAVRL	IKFLYQSNPP	PNPEGTRQAR		HXB-3	Rev
--SA-----	--E-IRT---	-----	-----		HXB-2	Rev
		60		80		
RNRRRRWRE	QRQIHSISER	ILSTYLGRSA	EPVPLQLPPL		HXB-3	Rev
-----	-----	--G-----	-----		HXB-2	Rev
		100		118		
ERLTLDCNED	CGTSGTQGVG	SPQILVESPT	ILESGAKE		HXB-3	Rev
-----	-----	-----	V----T--		HXB-2	Rev

**Abb. 39:** Dargestellt ist ein Vergleich der Rev-Aminosäuresequenzen aus den HIV-1 Isolaten HXB-3 (116 As) und HXB-2 (118 As).

In Abbildung 30 (S. 67) war auffällig, daß bei der Kotransfektion einer geringen Menge pcRev-Kompetitor zunächst ein Anstieg der CAT-Expression im Bindungstest stattfand. In Kapitel 4.2.1. wurde ausgeführt, daß die Bindung eines TatRev-Moleküls an SLIIB im Bindungstest für die CAT-Expression ausreicht, die Bindung eines Oligomers jedoch nicht ausgeschlossen werden kann. Dies könnte möglicherweise auch eine Folge der Überexpression durch den Transfektionsansatz sein (vgl. auch Kap. 4.3.).

Eine Beteiligung der Oligomerisierung bietet einen Erklärungsansatz für die offensichtlich stärkere Bindung in einem Ansatz mit TatRev und einer geringeren Menge wtRev. Das kleinere Hetero-Oligomer Rev/TatRev kommt der natürlichen Konformation Rev/Rev näher als TatRev/TatRev und erleichtert so unter Umständen die Bindung an die RNS. Dagegen reicht ein Molekül Tat im Komplex zur Transaktivierung aus, da Tat in monomerer Form die Transkription aktiviert (Stauber, R. H. und Pavlakis, G. N., 1998).

Mit steigender Menge Wildtyp-Rev wird dann Tat aus den Oligomeren ausverdünnt, darüber hinaus bindet Rev kompetitiv zu TatRev an SLIIB; die Bindung von TatRev wird inhibiert. Für RevM10BL konnte im Rahmen dieser Arbeit die Oligomerisierung nicht nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.6.2.), auch der beschriebene „Aktivierungs-Effekt“ einer geringen Menge konnte nicht gezeigt werden. Dies ist auch ein weiterer Hinweis darauf, daß der inhibitorische Effekt von RevM10BL hauptsächlich auf eine Bindung an die RNS zurückzuführen ist.

### RRE

Viele Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Inhibition der Rev-RRE-Interaktion mit dem Ziel, Moleküle zu finden, die zur Inhibition der HIV-Replikation therapeutisch einsetzbar sind. Darauf wurde am Beispiel von TDRev bereits eingegangen. RNS-interkalierende Agentien erwiesen sich als zelltoxisch (Schroder, H. C. et al., 1993) (Ratmeyer, L. et al., 1996). Auch für eine Reihe von Antibiotika wie Neomycin B konnte spezifisch eine Interaktion mit der Rev-

RRE-Bindung und damit eine Hemmung der HIV-Replikation nachgewiesen werden (Zapp, M. L. et al., 1993) (Werstuck, G. et al., 1996).

Eine weitere wichtige Gruppe von Inhibitoren sind Nukleinsäuren, die sowohl in „sense“- als auch in „antisense“-Orientierung potente Inhibitoren der HIV-Replikation darstellen ((Ding, S. F. et al., 1998), zusammengefaßt in (Heguy, A., 1997)). Die Expression von „antisense“-RNS in Zellen scheint sogar einen stärkeren Effekt zu haben als die Verwendung von TDRev (Veres, G. et al., 1998). Dabei sind schon Oligonukleotide von 13 Nukleotiden Länge wirksam, die hochaffin an Rev binden (Nakaya, T. et al., 1997).

Eine Kompetition im *in vivo* Bindungstest mit RRE konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine Reihe von Konstrukten, die die RRE in den Zellen exprimieren sollten, erwiesen sich als toxisch und konnten in diesem Zusammenhang nicht verwendet werden. Allerdings ist darauf hinzuweisen, daß die wesentlichen Schwierigkeiten im methodischen Ansatz begründet lagen, da auch in Kontrollzellen keine reproduzierbaren Werte messbar waren. Es darf daher nicht der Schluß gezogen werden, daß die Bindung prinzipiell nicht durch RNS zu hemmen ist.

Eine mögliche Ursache für die Toxizität wäre eine Akkumulation der RNS im Zellkern. Da die RNS nicht translatiert wird (Kap. 3.5.4.), könnte sie in der Zelle degradiert oder zunächst akkumuliert werden. Aufgrund der großen RNS-Menge nach der Transfektion könnten so wichtige Stoffwechselfvorgänge der Zellen behindert werden. Darüber hinaus wäre es denkbar, daß die Plasmide nicht oder nicht ausreichend exprimiert wurden. Um die Expression dieser kurzen RNS zu optimieren, könnte die Expression unter die Kontrolle eines Polymerase III-Promotors gestellt werden. Die Polymerase III synthetisiert in eukaryotischen Zellen kurze RNS wie die 5S rRNS und tRNS.

Um die Bindung von Rev an die komplette RRE *in vivo* zu untersuchen, wäre vorstellbar, den Bindungstest zu modifizieren, indem anstelle der SLIIB-Sequenz die RRE in den CAT-Vektor eingefügt würde. Dieses Vorgehen würde es jedoch nicht mehr erlauben, spezifisch die Bindung zu betrachten. Die RNS würde so auch Rev-abhängig ins Zytoplasma transportiert werden. Die Expression wäre dann von einer Reihe zusätzlicher Einflüsse wie der Bindung von Rev an Exportfaktoren abhängig. Darüber hinaus ist die RRE eine komplexe Sekundärstruktur, die den LTR-Promotor um ein Drittel vergrößern würde, so daß die Funktion des LTR selber in Frage gestellt wäre.

Die Kompetition der Rev/SLIIB-Bindung durch RRE ist eine wichtige Spezifitätskontrolle. In der vorliegenden Arbeit konnte die Bindung von Rev an seine Ziel-RNS nur unter Verwendung von SLIIB nachgewiesen werden. Dies zeigt zwar die initiale Bindung und die prinzipielle Anwesenheit und Funktionalität von Rev im Zellkern, es darf jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß unter Verwendung der kompletten RRE andere Einflußfaktoren eine zusätzliche Rolle spielen. Möglicherweise ist ein Astrozyten-spezifischer Faktor in der Lage, an einer anderen Stelle der RRE zu binden, damit SLIIB zu maskieren und die Bindung von Rev zu verhindern.

Daher sollte die Bindung von Rev an RRE in einem weiteren experimentellen Ansatz kritisch hinterfragt werden. Da der *in vivo* Ansatz mit Hilfe der Kompetitionen, der indirekt Hinweise

auf eine Bindung auch an die komplette RRE gegeben hätte, nicht reproduzierbar war, bleibt die Schwierigkeit, in einem *in vitro* Ansatz verschiedene Zelllinien zu vergleichen. Denkbar wäre eine Immunpräzipitation von Rev mit RRE aus Proteinextrakten wie es in Kapitel 4.2.2.1. vorgeschlagen wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß das Rev-Protein von HIV-1 in humanen Astrozyten in der Lage ist, seine Ziel-RNS SLIIB effizient und spezifisch zu binden. Auch über die Verwendung von verschiedenen Kompetitoren ließen sich keine Unterschiede zwischen Astrozyten und Kontrollzellen feststellen.

### 4.3. Die Oligomerisierung von Rev

Die Rev-Rev Oligomerisierung wurde wie die Bindung mit Hilfe eines *in vivo* Testsystems untersucht (Abb. 34, S. 72). Dadurch ist es möglich, die Oligomerisierung selektiv unter dem Einfluß zellspezifischer Faktoren im Vergleich verschiedener Zelllinien zu analysieren. Voraussetzung ist die Bindung von Rev an SLIIB im jeweiligen Zellkontext. Es wurden drei Astrozytomzelllinien im Vergleich zu zwei Kontrollzelllinien untersucht. Eine Oligomerisierung von Rev fand in allen Zelllinien statt (Abb. 37, S. 77).

Dagegen zeigte RevM10BL nicht die Fähigkeit zur Oligomerisierung, obwohl die M10BL-Mutation nicht die Oligomerisierungsdomäne betrifft. Da die Oligomerisierung wesentlich mit dem Mechanismus der Transdominanz in Verbindung gebracht wird (Kap. 1.1.2.2.2. und 4.2.2.2.), wurde sie bereits mit Hilfe verschiedenster Testsysteme geprüft. So befanden Szilvay et al. RevM10 im Zytoplasma der Zellen in einem *in vivo*-Ansatz Oligomerisierungs-kompetent (Szilvay, A. M. et al., 1997). Auch Stauber et al. fanden – jedoch unabhängig vom Kompartiment – RevM10 *in vivo* an der Oligomerisierung beteiligt (Stauber, R. H. et al., 1998). In einem „two-hybrid“ Ansatz in eukaryotischen Zellen stellten Bogerd und Greene dagegen keine Oligomerisierung von TDRev mit Wildtyp-Rev fest (Bogerd, H. und Greene, W. C., 1993), während im „two-hybrid“ Ansatz in *S. cerevisiae* RevM10BL und Wildtyp-Rev deutlich interagierten (Christian Bickel, GSF, Neuherberg, persönliche Mitteilung). *In vitro* in der „gel-shift“ Analyse konnte ebenfalls eine Oligomerisierung von RevM10 nachgewiesen werden (Zapp, M. L. et al., 1991) (Daly, T. J. et al., 1993).

Bei der Zusammenfassung dieser Daten wird deutlich, daß die Oligomerisierung an der RRE lediglich *in vitro* gezeigt werden konnte. Die *in vivo* Testsysteme basierten alle auf transienten Transfektionen und wiesen, mit Ausnahme des in dieser Arbeit angewandten Systems, keine Oligomerisierung an der RNS, sondern reine Protein/Protein-Wechselwirkung nach. Stauber et al. führten an, daß immer wieder Unterschiede aus *in vitro* zu *in vivo* Experimenten dokumentiert werden (Stauber, R. H. et al., 1998). Es besteht also durchaus die Möglichkeit, daß die Oligomerisierung im Zytoplasma und die Oligomerisierung an der RNS als unterschiedliche Ereignisse zu betrachten sind.

Cole et al. beschrieben, daß Rev in Lösung in hohen Konzentrationen oligomerisiert, jedoch in niedrigen Konzentrationen zunächst als Monomer die RNS bindet (Cole, J. L. et al., 1993). Watts et al. fanden eine Zusammenlagerung von Rev-Molekülen zu einer Filament-Struktur *in*

*vitro*, wobei sich in Gegenwart bzw. Abwesenheit von RNS unterschiedliche Formen ausbildeten (Watts, N. R. et al., 1998). Da die zur Verfügung stehenden *in vivo* Testsysteme auf transienten Transfektionen und damit einer Überexpression von Rev basieren, ist es durchaus denkbar, daß Rev auch im Zytoplasma oligomerisiert, eine „funktionelle Oligomerisierung“ aber erst an der RNS stattfindet.

Werden diese Schlußfolgerungen wieder in Bezug zu den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten zur Oligomerisierung von RevM10BL gesetzt, so ist es denkbar, daß für die Vorgänge nach der initialen Bindung an SLIIB auch die C-terminale Rev-Domäne von Bedeutung ist. Möglicherweise muß die Wirkung eines inhibitorischen Faktors (der z. B. an Strukturen wie benachbarte INS oder CRS bindet) überwunden werden, der in *in vitro* Experimenten bzw. in Experimenten ohne RNS nicht vorhanden ist. Für eine Beteiligung der C-terminalen Domäne auch an anderen als Exportvorgängen *in vivo* sprechen auch die Ergebnisse von Ludwig (Ludwig, E., 1999). Eva Ludwig beschrieb, daß Rev-Mutanten, in denen die NES gegen andere Leucin-reiche NES-Sequenzen ausgetauscht wurde, nicht funktionell sind. Dazu wurden NES-Sequenzen verwendet, die ebenfalls eine Wechselwirkung mit CRM1 als Exportrezeptor vermitteln (aus dem Transkriptionsfaktor TFIIA, (Fridell, R. A. et al., 1996) und dem Proteinkinase Inhibitor PKI (Fridell, R. A. et al., 1996)).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die uneingeschränkte Funktion der von der N-terminalen Domäne des Rev-Proteins vermittelten Eigenschaften in Astrozyten gezeigt werden. Rev ist trotz der ungewöhnlichen Lokalisation auch im Zytoplasma der Astrozyten prinzipiell in der Lage, in ausreichender Menge in den Kern zu gelangen und dort eine regulatorische Funktion zu erfüllen. Die RNS-Bindung und die Rev/Rev-Oligomerisierung und damit auch der Kernimport sind funktionell. Damit ist es wenig wahrscheinlich, daß ein Astrozyten-spezifischer inhibitorischer Mechanismus gegen die N-terminale Domäne von Rev gerichtet ist bzw. seinen Ursprung im Zellkern der Astrozyten hat.

#### **4.4. Ein Modell zur verminderten Rev-Transaktivierung in Astrozyten unter Einbeziehung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten**

Abschließend wird ein Überblick über den Rev-Regulationszyklus in Astrozyten unter Einbeziehung der bisher gewonnenen Daten gegeben. Es werden Einflußfaktoren diskutiert, die zu einer verminderten Rev-Transaktivierung in Astrozyten führen könnten und weitere Experimente zu deren Aufklärung vorgeschlagen. Dazu wurde die Abbildung 40 in Anlehnung an Abbildung 2 (S. 5) modifiziert, wobei nun auf die spezifische Rev-Regulation in Astrozyten Bezug genommen wurde.

Ziel der Abbildung ist, einen schematischen Überblick zu geben, der bereits gewonnene Daten zusammenfaßt und es ermöglicht, Ansätze für weitere experimentelle Analysen aufzuzeigen. Aufgrund der Komplexität dieser Regulation ist das Schema keinesfalls vollständig und muß viele Einzelschritte außer Acht lassen. So besteht beispielsweise der Kernimport aus

einer Reihe von Assoziations- und Dissoziationsschritten mit zellulären Faktoren wie Importin  $\beta$  und Strukturen der Kernporen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Funktion von Tat in Astrozyten nicht eingeschränkt ist und der HIV-LTR auch in diesem zellulären Kontext einen effizienten Promotor darstellt (Kap. 3.3.1.). Die Expression von Rev-mRNS konnte demonstriert werden (Neumann, M. et al., 1995) (Gorry, P. R. et al., 1999). Auch die Synthese von Rev wurde bestätigt ((Neumann, M. et al., 1995) (Ludwig, E. et al., 1999), sowie die Abbildungen 14 und 24 (S. 37 und 52) zur Lokalisation von Rev und Rev-Mutanten in dieser Arbeit). Eine verminderte Rev-Expression kann als Ursache für die verminderte Transaktivierung ausgeschlossen werden.

Die eingeschränkte Rev-Transaktivierung in Astrozyten geht mit einer ungewöhnlichen, stark zytoplasmatischen Lokalisation von Rev einher, wobei aber der Import in den Kern prinzipiell möglich ist. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Funktionalität der kernassoziierten Rev-Funktionen bestätigt werden. Bisher unveröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe wiesen auf einen verlangsamten Import von Rev in den Astrozytenkern hin (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg, persönliche Mitteilung).

Im Zellkern findet die Bindung der RNS und die Oligomerisierung statt. Beide Funktionen sind aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse nicht eingeschränkt. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, daß im gewählten experimentellen Ansatz nur eine Bindung an SLIIB gezeigt werden konnte.

Die nächste Frage, die sich ergibt, betrifft den Transport der Rev/RNS-Komplexe ins Zytoplasma. Dazu sind zwei mögliche Szenarien denkbar: Der Transport von Rev mit oder ohne RNS. Es werden im folgenden kurz Daten zusammengefaßt, die die Verteilung der RNS in den Zellen betreffen und in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind.

Neumann et al. zeigten am Beispiel der chronisch infizierten Astrozytomzelllinie TH4-7-5, daß die Verteilung der HIV-Transkripte in diesen Zellen der Verteilung in Rev-negativen Zellen entspricht, in denen nur eine geringe Menge Rev-abhängig regulierter RNS zu finden ist ((Neumann, M. et al., 1995), Kap. 1.3.4.). Diese Untersuchungen wurden von Tornatore et al. in primären Astrozyten bestätigt (Tornatore, C. et al., 1994). Dagegen zeigten Gorry et al., daß das Transkriptmuster in U251-Astrozytomzellen gegenüber HeLa-Zellen nicht verändert war und beschrieben für beide Zelllinien eine ähnliche Transportrate für ungespleißte Transkripte ins Zytoplasma (Gorry, P. R. et al., 1999).

Ein wesentlicher Bestandteil zukünftiger Arbeiten sollte also eine Verifizierung der Verteilung von Rev-abhängig regulierten Transkripten in Astrozyten sein. Zur Analyse würden sich Northern-Blot-Analysen anbieten, die die Menge an mRNS in Kern- und Zytoplasmafraktion der Zellen quantifizieren und so den Anteil an in das Zytoplasma transportierter RNS bestimmen ließen. Dies würde wichtige Erkenntnisse darüber liefern, ob beispielsweise der Rev/RNS-Komplex im Kern instabil ist und daher Rev ohne seine Ziel-RNS wieder ins Zytoplasma transportiert wird, oder ob der Komplex zunächst transportiert wird und ein nachfolgender Schritt ursächlich beeinträchtigt ist. Denkbar wären auch Experimente wie sie von Boe et al. beschrieben wurden (Boe, S. O. et al., 1998). Über ein kombiniertes Verfahren

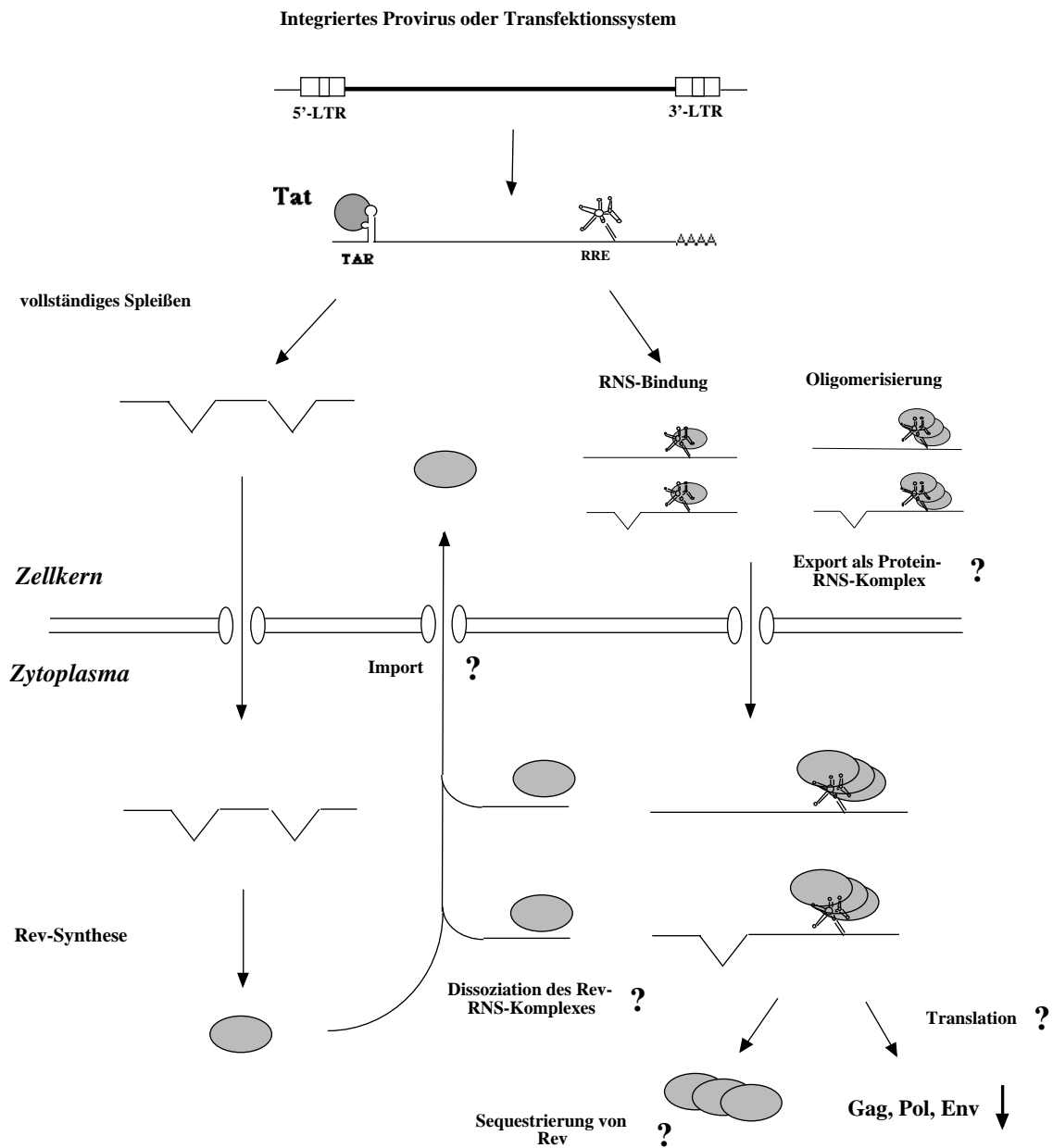
aus Immunfluoreszenz und *in situ* Hybridisierung ist es den Autoren gelungen, eine Kollokalisierung von Rev und RNS auf Einzelzellebene durchzuführen.

Über den Mechanismus der Dissoziation des Rev-Oligomers im Zytoplasma und die Freisetzung der RNS kann im Augenblick nur spekuliert werden. Das Fehlen eines für die Dissoziation des Oligomers wichtigen zellulären Faktors oder das Vorhandensein eines inhibitorischen Faktors in Astrozyten könnte eine Bindung an Importin  $\beta$  verhindern und so Rev im Zytoplasma sequestrieren. Aus der Sequestrierung könnte sich eine verstärkte Assoziation von Rev mit der RNS ergeben, die eine effiziente Translation behindert.

Eine weitere Hypothese, die sich aus der Sequestrierung von Rev ergeben könnte, wäre eine vorzeitige Freisetzung der RNS durch die Interaktion mit einem Astrozyten-spezifischen, kompetitiven Faktor. Dadurch könnte ebenfalls eine effiziente Translation behindert werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die im Zellkern stattfindenden Funktionen des HIV-Rev-Proteins und damit auch prinzipiell der Import in den Zellkern im Kontext der Astrozyten nicht eingeschränkt sind. Diese Funktionen werden wesentlich von der N-terminalen Domäne von Rev vermittelt. Es konnte ausgeschlossen werden, daß Rev in Astrozyten inaktiviert wird; vielmehr scheint nur eine geringere Rev-Menge in den Kern zu gelangen, die dort aber funktionell ist. Ein inhibitorischer, Astrozyten-spezifischer Einfluß, z. B. durch die Bindung eines zellspezifischen Faktors, ist daher für die N-terminale Domäne des Proteins nur anzunehmen, wenn die N-terminal vermittelten Funktionen dadurch prinzipiell nicht eingeschränkt werden.

Es erscheint sinnvoll, zukünftige Arbeiten auf zytoplasmatische Vorgänge der Rev-Regulation zu konzentrieren. Wesentlich ist dabei die Untersuchung der RNS-Transportrate in den Zellen und die weitere Analyse und Quantifizierung insbesondere der Im- und Exportaktivitäten von Rev in Astrozyten. Ein weiterer wichtiger Punkt wäre die Suche nach einem Astrozyten-spezifischen Faktor, der Rev durch eine reversible Bindung im Zytoplasma sequestrieren könnte.



Rev-assoziierte Besonderheiten der HIV-Replikation in Astrozyten:

- ⇒ größtenteils zytoplasmatische Lokalisation von Rev
- ⇒ erheblich verminderte Expression Rev-abhängig exprimierter Transkripte
- ⇒ **verminderte Virusproduktion**

**Abb. 40:** Die Abbildung gibt die Rev-Regulation in Astrozyten schematisch wieder. Dabei sind Vorgänge, die in Astrozyten noch nicht näher analysiert wurden und möglicherweise an der Ausprägung der verminderten Rev-Transaktivierung beteiligt sind, mit „?“ gekennzeichnet. Für Erläuterungen siehe auch die Legende zu Abb. 2.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Astrozyten sind Zielzellen für HIV im ZNS. Sie weisen nach ihrer Infektion jedoch nur eine geringe Virusproduktion auf. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß die verminderte Virusreplikation auf eine erheblich eingeschränkte Funktion des viralen Regulators Rev zurückzuführen ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktionen von Rev im spezifischen Kontext der Astrozyten genauer zu untersuchen.

Dazu wurde zunächst die Rev-abhängige Transaktivierung des Reportergens *cat* in verschiedenen Zelllinien geprüft. Es konnte gezeigt werden, daß die verminderte Produktion von HIV-Strukturproteinen in Astrozyten nicht auf den inhibitorischen Effekt einer speziellen RNS zurückzuführen ist, sondern daß die Rev-Funktion in Astrozyten auch am Beispiel dieser heterologen RNS vermindert ist. Eine signifikant reduzierte Rev-Transaktivierung konnte in fünf getesteten Astrozytomzelllinien im Vergleich zu zwei Kontrollzelllinien festgestellt werden.

Demgegenüber konnte die uneingeschränkte Funktion des zweiten untersuchten viralen Regulatorproteins, Tat, für alle getesteten Astrozytomzelllinien gezeigt werden.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Anwendung von *in vivo* Testsystemen, die es ermöglichten, Teilschritte aus der komplexen Rev-Regulation im Kontext verschiedener Astrozytom- und Kontrollzelllinien zu analysieren und zu vergleichen. Es wurden die von der N-terminalen Rev-Domäne vermittelten Funktionen der RNS-Bindung und der Rev/Rev-Oligomerisierung näher untersucht. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen Astrozytom- und Kontrollzellen festgestellt werden. Die Spezifität der gezeigten Daten wurde in einer Reihe von Konkurrenzexperimenten bestätigt. Die Ergebnisse wurden darüber hinaus durch Lokalisationsstudien unterstützt. Die in dieser Arbeit verwendeten Rev-Mutanten und Fusionsproteine zeigten im Gegensatz zum Rev-Protein selber keinen Lokalisationsunterschied zwischen Astrozytom- und Kontrollzellen.

Somit konnte ausgeschlossen werden, daß die im Wesentlichen kernassoziierten Funktionen von Rev in Astrozyten beeinträchtigt sind. Die Ursache für die verminderte Rev-Transaktivierung in diesen Zellen konnte damit näher eingegrenzt werden. Weitere Studien sollten sich verstärkt auf die zytoplasmatischen Vorgänge der Rev-Regulation konzentrieren sowie auf den Transport von Rev zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten.



## **6. MATERIAL UND METHODEN**

### **6.1. Materialien und Bezugsquellen**

#### **6.1.1. Zelllinien**

##### *Astrozytomzelllinien*

- 85HG66

Humane CD4-negative Astrozytomzelllinie (Stavrou, D. et al., 1987) (Stavrou, D. et al., 1989) (Brack-Werner, R. et al., 1992), etabliert aus einem Gehirntumor (Astrozytom). Parentale Zelllinie der chronisch mit HIV-1 infizierten Zelllinie TH4-7-5 (Brack-Werner, R. et al., 1992).

- U-87MG (U87)

Humane Astrozytom-/Glioblastomzelllinie aus einem Tumor III. Grades. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (ATCC HTB-14) (Bagasra, O. et al., 1992).

- U-138MG (U138)

Humane Zelllinie aus einem Glioblastom. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (ATCC HTB-16) (Bagasra, O. et al., 1992) (Chiodi, F. et al., 1987).

- U-251MG (U251)

Humane Astrozytomzelllinie aus einem „Glioblastoma multiforme“. Die Zellen wurden von M. Brenner, NIH, zur Verfügung gestellt (Bigner, D. D. et al., 1981).

- U-373MG (U373)

Humane CD4-negative Astrozytomzelllinie aus einem Tumor III. Grades. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (ATCC HTB-17) (Dewhurst, S. et al., 1987) (Harrington, R. D. und Geballe, A. P., 1993).

##### *HIV-1 permissive Kontrollzelllinien*

- HeLa

Humane epitheloide Zelllinie aus einem Cervixcarzinom (Fibroblasten), die humanes Papillomavirus 18 enthält. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (ATCC CRL-7923).

- HEK293

Humane embryonale Nierenzelllinie (Human Embryonal Kidney), transformiert durch das humane Adenovirus 5 (Ad5). Die Zellen enthalten und exprimieren die transformierenden Gene von Ad5 (Graham, F. L. et al., 1977) und wurden von ATCC bezogen (CRL-1573).

#### **6.1.2. Plasmide**

##### *Reportergenkonstrukte*

- pSLIIBCAT

Das Plasmid exprimiert das Reportergen Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) unter der Kontrolle der HIV-LTR. Die mittleren 10 Nukleotide (= äußere Schleife) der TAR-Sequenz

(Tat-Bindesequenz innerhalb der R-Region der LTR) wurden gegen SLIIB (stem loop IIB) ausgetauscht. SLIIB ist die minimale RNS-Bindesequenz für Rev innerhalb der RRE. Sie wurde mit Hilfe eines synthetischen Oligonukleotids von 29 Nukleotiden Länge (5'-GATCGAGCTGGGCGCAGCGCAATGCGCTGACGGTAC-3') eingesetzt (Tiley, L. S. et al., 1992). Zum Aufbau von TAR und RRE vgl. Abb. 3 und 5, S. 7 und 11 dieser Arbeit.

- pHIVLTRCAT

Das Plasmid enthält das Reporter-gen *cat* unter der Kontrolle der HIV-LTR aus dem Isolat HIV<sub>Bru</sub> (Ludvigsen, A. et al., 1996).

- pHIV npsLTRCAT

Das Plasmid ist ein Derivat von pHIVLTRCAT. Durch Restriktion mit den Enzymen NruI und BglII wurden Bereiche des *nef*-Gens an der 5'-Seite der LTR deletiert (nps = *nef* partial sequence). Es konnte gezeigt werden, daß dieser Bereich sich negativ auf die Aktivität der LTR in Astrozyten auswirkt (Ludvigsen, A. et al., 1996).

- pDM128

Die Expression des *cat*-Reporter-gens steht in diesem Plasmid unter der Kontrolle des SV40-Promotors und ist Rev-abhängig (Hope, T. J. et al., 1990). *Cat* wird nur dann effizient exprimiert, wenn Rev die RRE bindet und somit ein Spleißen verhindert wird. Das Plasmid wurde von Dr. Thomas Hope, Infectious Disease Laboratories, The Salk Institute, La Jolla, USA, zur Verfügung gestellt.

- pB37R

Das Plasmid exprimiert in Abhängigkeit von Rev die kodierende Region des HIV-1 Gens p37<sup>Gag</sup> aus dem Klon HXB-2. Promotor ist der HIV-1-LTR, die Expression von p37<sup>Gag</sup> ist somit auch Tat-abhängig (Neumann, M. et al., 1995). Das Plasmid wurde von Dr. George Pavlakis, NCI, Maryland, USA, zur Verfügung gestellt.

- pGL3-RFB

Der Basisvektor pGL3-basic wurde von Promega Corporation, Madison, WI, USA, bezogen, und enthält das *luciferase*-Gen ohne Promotor. Der RFB-Promotor (aus dem Reilley-Finkel-Biskis C-Typ Retrovirus der Maus, (Gimbel, W. et al., 1996)) wurde SacI/BglII vor das *luciferase*-Gen kloniert (Frech, K. et al., 1997).

- pRSVluc

Luciferase-Expressionsplasmid unter der Kontrolle der Rous sarcoma virus (RSV) LTR (de Wet, J. R. et al., 1987). Der Vektor enthält das SV40 T-Antigen und das SV40 Polyadenylierungssignal. Die Sequenzen wurden in pBR322 kloniert (Dr. George Pavlakis, NCI, Maryland, USA).

### *Expressionsplasmide für HIV-Proteine*

- pcTat

Die Expression des viralen Regulatorproteins Tat steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Die Tat-Sequenz stammt aus dem HIV-1 c-DNS Klon HXB-3 und enthält somit keine Intronsequenzen (Malim, M. H. et al., 1988) (Malim, M. H. et al., 1989). Tat hat in diesem Konstrukt 86 As Länge (vgl. Kap. 1.1.2.2.1.) und wurde in den Basisvektor pBC12/CMV

(Cullen, B. R., 1986) kloniert. Das Plasmid wurde von Dr. Bryan Cullen, Durham, USA, zur Verfügung gestellt.

- pcRev

Die Expression des Rev-Proteins aus dem HIV-1 Isolat HXB-3 steht unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Die Rev-Sequenz stammt aus einem c-DNS Klon und enthält somit keine Intronsequenzen (Malim, M. H. et al., 1988) (Malim, M. H. et al., 1989). Rev hat in diesem Konstrukt volle Länge (116 As) und wurde in den Basisvektor pBC12/CMV (Cullen, B. R., 1986) kloniert. Das Plasmid wurde von Dr. Bryan Cullen, Durham, USA, zur Verfügung gestellt.

- pcTatRev

Das Plasmid exprimiert ein TatRev-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promoters (Tiley, L. S. et al., 1992). Der Basisvektor ist pBC12/CMV (Cullen, B. R., 1986). Tat und Rev haben volle Länge und sind funktionell (Madore, S. J. et al., 1994). Das Plasmid wurde von Dr. Bryan Cullen, Durham, USA, zur Verfügung gestellt. Die Nukleotidfolge der kodierenden Bereiche wurde durch Sequenzierung bestätigt.

- pcTatRevM5

Das Plasmid exprimiert ein Fusionsprotein aus Tat und der Mutante RevM5 (vgl. pcRevM5) (Thomas, S. L. et al., 1998). Die Expression steht unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Der Basisvektor ist pBC12/CMV (Cullen, B. R., 1986). Das Plasmid wurde von Dr. Joachim Hauber, Erlangen, zur Verfügung gestellt.

- pcRevM5

Das Plasmid exprimiert die Rev-Mutante M5 unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Gegenüber Wildtyp-Rev wurden die As 38 und 39 von R R nach D L ausgetauscht (Malim, M. H. et al., 1989). Dazu wurden die Nukleotide 110 bis 115 der Wildtyp-Rev Sequenz von -CCGAAG- zu -AGATCT- verändert. Die Mutante ist Bindungs-defekt, oligomerisiert jedoch und ist nicht transdominant negativ (Madore, S. J. et al., 1994). Der Basisvektor ist pBC12/CMV (Cullen, B. R., 1986). Das Plasmid wurde von Dr. Bryan Cullen, Durham, USA, zur Verfügung gestellt. Die kodierenden Abschnitte des Plasmids sowie der Promotor wurden durch Sequenzierung bestätigt.

- pBsRevM10BL

In pBsRev wurde die M10BL-Mutation eingeführt (Stauber, R. et al., 1995). Es sind zwei Bereiche des *rev*-Gens mutiert. An As-Position 78/79 wurde L E zu D L ausgetauscht und zwischen Position 82 und 83 wurde eine Insertion von vier As (E D L P) eingeführt (BL-Mutation). RevM10 verbleibt aufgrund dieser NES-Mutation (nukleäres Exportsignal) im Kern, ist nicht mehr funktionell und hat einen dominant-negativen Phänotyp (Stauber, R. et al., 1995).

### *Sonstige Plasmide*

- pCTatRevsg143

Die TatRev-Sequenz aus pcTatRev wurde zur Konstruktion dieses Vektors in den GFP-Vektor pFred143 kloniert. Dadurch entstand ein Fusionsprotein (N-terminal nach C-terminal) Tat-Rev-GFP. Es findet keine Expression von GFP ohne Fusionspartner statt (Ludwig, E., 1999).

- pRevM5GFP

Die RevM5-Sequenz wurde in den GFP-Basisvektor pFred143 kloniert. RevM5 befindet sich N-terminal von GFP. Der Vektor wurde durch Sequenzierung verifiziert (Francesca Ceccherini-Silberstein, GSF, Neuherberg).

- pFred143 (KH1035)

GFP-Expressionsplasmid. Die Expression von GFP (green fluorescent protein) steht unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Der Vektor enthält das SV40 Polyadenylierungssignal (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg).

- pF25-Tat-GFP

Das Plasmid enthält die HIV-1 Tat-Sequenz aus dem Isolat pNL4-3 unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Die GFP-Sequenz ist C-terminal angefügt. Der Vektor wurde von Roland Stauber im Labor von Dr. George Pavlakis, NCI, Maryland, USA konstruiert.

- pBSPL

Bluescript-Vektor (Neumann, M. et al., 1995), modifiziert von Stefan Schwartz im Labor von Dr. George Pavlakis, NCI, Maryland, USA. Dieser Vektor wird nicht exprimiert.

- pcRRE

Zur Konstruktion dieses Vektors wurden die kodierenden Sequenzen aus pcTatRev entfernt, die Enden aufgefüllt und die Sequenz der RRE aus dem Vektor Bluescript KS 330 (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg) eingefügt. pcRRE wird transkribiert, eine Translation findet jedoch nicht statt, da kein Startkodon enthalten ist. Die RRE und der umgebende Vektorhintergrund wurden sequenziert (Jutta van Empel, GSF, Neuherberg).

- pcRRE 12s

Zur Konstruktion dieses Vektors wurden die kodierenden Sequenzen aus pcTatRev entfernt, die Enden aufgefüllt und die Sequenz der RRE mit einer Deletion von 61 Nukleotiden im Bereich des SLIIB aus dem Vektor Bluescript KS 330 12 (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg) eingefügt. pcRRE 12s wird transkribiert, eine Translation findet jedoch nicht statt, da kein Startkodon enthalten ist. Die RRE und der umgebende Vektorhintergrund wurden sequenziert und die Deletion bestätigt (Jutta van Empel, GSF, Neuherberg).

Alle Plasmide tragen als Selektionsmarker das Ampicillinresistenzgen.

### **6.1.3. Antikörper**

- Polyklonaler Kaninchen anti Rev Antikörper (#29994, Testblutung 8), hergestellt im Labor von Dr. George Pavlakis (NCI, Maryland, USA) unter Verwendung von rekombinantem Rev des HIV-Isolats HXB-2 aus *E. coli*.
- Cyanine3 konjugierter Ziege anti Kaninchen Antikörper, polyklonal (Dianova).

### **6.1.4. Chemikalien**

1-kb-DNS Längenstandard

Gibco, Karlsruhe

Acetyl-Coenzym A	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Agarose (Seakem)	FMC Bio Products, Rockland, USA
Agarose (MP)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Alkalische Phosphatase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Amplitaq <sup>®</sup> DNS Polymerase	Perkin Elmer Cetus, Überlingen
Amplitaq Gold <sup>™</sup>	Applied Biosystems, Weiterstadt
Ampuwa <sup>®</sup>	Fresenius, Bad Homburg
Antibiotische/Antimykotische Lsg.	Life Technologies, Eggenstein
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin	Löwe Biochemika, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
dNTPs	Pharmacia Biotech, Freiburg
DC-Platten (Kieselgel-beschichtet)	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Filter 0.22µm	Nalgene, USA
Filterpapier, Whatman 3mm	Whatman, Maidstone, GB
FKS	Gibco, Karlsruhe
Formaldehyd, 37%	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin	Life Technologies, Eggenstein
Hoechst 33342 (Bisbenzimid)	Molecular Probes, Oregon, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
IPTG	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
MOPS	Merck, Darmstadt
Nonidet NP-40 <sup>®</sup>	Sigma, Deisenhofen
10x PCR Reaktionspuffer	Perkin Elmer Cetus, Überlingen
10x Phosphorylierungspuffer	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Plastikmaterial f. Zellkultur	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Phenol	Life Technologies, Eggenstein
Polaroid s/w Film 667	Polaroid, Offenbach
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
	New England Biolabs, Schwalbach
SDS	Löwe Biochemika, München
Sequagel Sequencing System	National Diagnostics, Georgia, USA
T4 DNS Ligase	Gibco, Karlsruhe
T4 Polynukleotidkinase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Tris	Löwe Biochemika, München
Triton® X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween® 20	Sigma, Deisenhofen
Zählkammer (für eukaryotische Zellen)	Madaus Diagnostics, Köln

Weitere Gebrauchswaren und Laborartikel wurden von den Firmen Agfa Gevaert (Belgien), Amersham (Braunschweig), Bachhofer Laborbedarf (Reutlingen), Beckman (München), Bender und Hobein (München), Eastman Kodak (Rochester, USA), Greiner (Nürtingen), Kremer & Kreiler (München) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

### **6.1.5. Puffer und Lösungen**

Ampicillin-Lösung	50 mg/ml Ampicillin in A. d.
Aqua dest. (A. d.)	Filtration durch Millipore Anlage (Millipore Water System, Eschborn)
Auftragspuffer (DNS)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerin; in A. d.
CAT Lysis Puffer (Roche)	Triton X-100 in MOPS
Ethidiumbromidlösung	1% (w/v) Ethidiumbromid in A. d.
„Freeze-Squeeze“-Puffer	0,5 M NaAcetat 1 mM EDTA, pH 5,8
Lösung A	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8,55 g NaOH 2 g Natriumtartrat 0,8 g NaHCO <sub>3</sub> 4,75 g BCA-Na <sub>2</sub> 5 g mit A. d. ad 500 ml, pH 11
Lösung B	CuSO <sub>4</sub> 2 g mit A. d. ad 50 ml
Luciferase Assay Substrat (Promega)	Coenzym A (Lithium Salz) 470 µM Luciferin 530 µM ATP, lyophilisiert
Luciferase Assay Puffer (Promega)	20 mM Tricin 1,07 mM (MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> x5H <sub>2</sub> O 2,67 mM MgSO <sub>4</sub> 0,1 mM EDTA 33,3 mM DTT
PBS	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 9,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O

	2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in A. d.
Puffer P1 (Qiagen)	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
Puffer P2 (Qiagen)	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer P3 (Qiagen)	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
Puffer A (Pharmacia Biotech, Freiburg)	0,5 M CaCl <sub>2</sub> in 0,1 M HEPES pH 7,0
Puffer B (Pharmacia Biotech, Freiburg)	0,28 M NaCl 0,75 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,75 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 0,05 M HEPES, pH 7,0
Puffer QBT (Qiagen)	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15% EtOH 0,15% Triton X-100
Puffer QC (Qiagen)	1 M NaCl 50 mM MOPS 15% EtOH, pH 7,0
Puffer QF (Qiagen)	1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl 15% EtOH, pH 8,5
TAE (50x)	2 M Tris-Acetat 100 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
TE	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA
TNE	40 mM Tris/HCl 1 mM EDTA 150 mM NaCl pH 7,4 in A. d.
Trypsin-EDTA Lösung	Seromed, Berlin

Hier nicht aufgeführte Lösungen sind in den entsprechenden Methodenteilen beschrieben. Alle Puffer für die Zellkultur und Bakterienanzucht wurden vor Gebrauch autoklaviert. Die Enzypuffer wurden von den Herstellerfirmen der entsprechenden Enzyme bezogen.

#### **6.1.6.    *Verwendete Kits***

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendungszweck</b>
BCA Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford, USA	Bestimmung der Gesamt-

Kit		proteinmenge in Zellysaten
CAT ELISA Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim	Bestimmung der CAT-Menge in Zellysaten
Cellpfect Transfection Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg	Transiente Transfektion von adhären Zellen
High Fidelity PCR Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim	PCR-Reaktionen
Luciferase Assay System	Promega, Madison, USA	Bestimmung der Luciferase-aktivität in Zellysaten
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden	Großpräparation von Plasmiden
Qiaquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden	Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen
Rapid Ligation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim	Ligation von DNS-Fragmenten mit unterschiedlichen Enden
Sequencing Kit	ABI	Sequenzierung von DNS
Qiaquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden	Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen
FAST CAT <sup>®</sup> Green (deoxy) CAT Kit	Molecular Probes, Oregon, USA	Bestimmung der CAT-Aktivität in Zellysaten

---

### **6.1.7. Medien**

Für die Zellkultur wurde DMEM mit Glutamax-I und 4,5 g/l Glukose (Life Technologies) verwendet. Vor Gebrauch wurden 10% (v/v) mindestens eine Stunde zur Inaktivierung des Komplementsystems auf 56°C erwärmtes fötales Kälberserum (FKS, Life Technologies) zugegeben. Dazu kam bei Bedarf 1% Antibiotika/Antimykotika Lösung (AB/AM, Life Technologies), entsprechend 100 Einheiten Penicillin, 100 µg Streptomycin und 0,25 µg Fungizone<sup>®</sup>/ml.

Bakterienstämme wurden in LB-Flüssigmedium mit 50 ng/ml Ampicillin herangezogen oder auf LB/Amp-Platten (50 ng/ml Ampicillin) ausgestrichen.

*Einfriermedium für eukaryotische Zellen*

- 35 ml DMEM
- 10 ml FKS
- 5 ml DMSO
- 0,5 ml AB/AM

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

#### *Bakterienmedien*

LB-Medium (nach Luria-Bertani)

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- ad 1000 ml mit A. d., pH 7,0

Einfriermedium für Bakterien

- 2 Teile 80% Glycerin



---

SOC	1 Teil 10 mM NaCl <sub>2</sub> Vollmedium ohne Selektion (Stratagene)
-----	--

## 6.2. Methoden

### 6.2.1. Allgemeine Zellkulturtechniken

#### 6.2.1.1. Kultivierung adhärenter Zellen und Zellzahlbestimmung

Alle Zelllinien wurden bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Medium wurde DMEM verwendet (vgl. Kap. 6.1.7.), das, sofern nicht gesondert vermerkt, mit 10% FKS und 1% AB/AM versetzt wurde. Die Zellen wurden zweimal pro Woche umgesetzt. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Es wurde wenig Trypsin-EDTA-Lösung (Seromed) zugegeben und die Zellen so in 5-10 min bei 37°C vom Boden der Kulturgefäße gelöst. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien wurden die Zellen in frischem Medium in Verdünnungen von 1:5-1:15 in neue Gefäße überführt. Die Zellen wurden nicht länger als 30 Passagen auf diese Weise in Kultur gehalten, dann wurden neue Zellaliquots niedriger Passagenzahl aufgetaut, um für die verschiedenen Experimente immer möglichst gleiche Voraussetzungen zu schaffen. Dies erschien notwendig, da zu lange Kultivierung von Zellen zu Alterungseffekten führen kann, die sich auf Messdaten auswirken können.

Die genaue Nomenklatur für die Zelllinien ergibt sich durch das Anfügen der aktuellen Passagenzahl; ist eine Zelllinie beispielsweise mit p3+12 bezeichnet, bedeutet dies, daß die Zellen nach der dritten Passage eingefroren, dann wieder aufgetaut und seither 12 Mal passagiert wurden.

Zur Einsaat von Zellen für Transfektionen, das Überführen einer bestimmten Anzahl von Zellen in 35 oder 60 mm Schälchen, mußte die Zellzahl bestimmt werden. Dazu wurde ein Tropfen der Zellsuspension in eine Zählkammer (Madaus Diagnostics, Köln) gegeben und die Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt. Die Anzahl der Zellen in einem Großquadrat (entsprechend 16 Kleinquadraten) ergab mit 10<sup>4</sup> multipliziert die Zellzahl pro ml der Ausgangssuspension.

#### 6.2.1.2. Mykoplasmenfärbung und Behandlung der Zellen bei Mykoplasmenbefall

Modifiziert nach (Schmidt, J. und Erfle, V., 1984) und (Schmitt, K. et al., 1988).

Zur Kontrolle von Mykoplasmenbefall wurde eine DNS-Färbung mit Bisbenzimid durchgeführt. Etwa 2x10<sup>5</sup> der zu untersuchenden Zellen wurden in 60 mm Schälchen eingesät und nach 24 h mit eiskaltem Methanol/Acetat (1:3) für 10 min fixiert. Nach Abnehmen der Lösung wurde der Schälchenboden mit Bisbenzimid-Lösung bedeckt (0,5-1 µg/ml in A. d.) und die Zellen 10-15 min im Dunkeln bei RT zur Anfärbung der DNS inkubiert. Die Schälchen wurden mit A. d. gewaschen, ein Tropfen PBS/Glycerin zugegeben und ein Deckgläschen aufsetzt. Die Kerne waren nun im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines Blaufilters nach Anregung

durch Licht einer Wellenlänge von 360 nm gut sichtbar. Extrazelluläre DNS-Färbung und Färbung an den Außenbereichen der Zellen deuten auf Mykoplasmen hin.

Die Behandlung von Mykoplasmen erfolgte mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin. Es wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml dem Zellkulturmedium zugesetzt und das Medium alle drei Tage erneuert. Einmal pro Woche wurde die Mykoplasmenfärbung durchgeführt. Konnten keine Mykoplasmen mehr gefunden werden, wurden die Zellen noch eine weitere Woche behandelt und dann minikloniert. Dazu wurden etwa 10 Zellen pro Vertiefung in eine 96-Loch-Platte überführt und von dort ausgesuchte Klone weiter expandiert.

#### *6.2.1.3. Auftauen und Einfrieren von Zellen*

In flüssigem Stickstoff gefrorene Zellen in Kryoröhrchen wurden rasch in den Händen angetaut, so daß ein Eiskern erhalten blieb, und in 50 ml kaltes DMEM überführt, um das zellschädigende DMSO aus dem Einfriermedium auszuverdünnen. Die Zellen wurden 5 min bei 350xg zentrifugiert, das Zellpellet in 3 ml vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und die Suspension in eine kleine Kulturflasche überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel. Entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen weiter expandiert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst und nach Zellzahlbestimmung in 50 ml Falcon-Röhrchen 10 min bei 350xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in Nunc-Röhrchen überführt und auf Eis gehalten. Im Kryostaten wurden die Zellen um 1°C pro Minute bis auf -30°C abgekühlt und anschließend ü/N bei -80°C gehalten. Die Zellen wurden dann in flüssigem Stickstoff bei -196°C dauerhaft gelagert.

#### *6.2.1.4. Transiente Transfektion adhärenter eukaryotischer Zellen*

##### **6.2.1.4.1. Die CaPO<sub>4</sub>-Präzipitation**

Zur Transfektion wurde in der Regel die CaPO<sub>4</sub>-DNS-Kopräzipitationsmethode nach Graham mit Modifikationen nach Felber et al. angewandt (Graham, F. L. et al., 1977) (Felber, B. K. et al., 1990).

Die Zellen wurden zur Transfektion in 35 oder 60 mm Schälchen eingesät, trypsiniert, gezählt, mit Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und die Schälchen überführt. Je nach Größe der Zellen und Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Zelllinien ergaben sich folgende optimale Zellzahlen zur Einsaat in 60 mm Schälchen 24 h vor der Transfektion:

<b>Zelllinie</b>	85HG66	U138	U373	U87	U251	HeLa	HEK293
<b>Zellzahl</b>	$6 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$4 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	$8 \times 10^5$	$8 \times 10^5$

Die optimale Menge Medium pro 60 mm Schälchen betrug 5 ml. Nach 24 h Anheftungszeit (für HEK293 bis zu 48 h, da diese Zellen nur sehr langsam am Gefäßboden anheften und nach zu kurzer Inkubationszeit durch den Transfektionsvorgang wieder abgewaschen werden können) sollten die Zellen etwa 60-70% konfluent gewachsen sein, um optimale Transfektionseffizienzen zu erzielen. Die Transfektionen wurden mit dem Puffersystem des „Cell Pfect“-Transfektionskits von Pharmacia Biotech, Freiburg, durchgeführt.

Für jeden unterschiedlichen Transfektionsansatz wurde die entsprechende Plasmidmischung vorgelegt und mit pBSPL als „Leerplasmid“ die Plasmidgesamtmenge pro Schälchen auf 17 µg eingestellt. Der Ansatz wurde auf 120 µl pro Schälchen mit sterilem Wasser aufgefüllt. Dazu wurden 120 µl Puffer A pro Schälchen gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Dieser Mix wurde nun sehr vorsichtig zu der doppelten Menge (240 µl pro Schälchen) Puffer B in 50 ml Falcon-Röhrchen getropft und 15 min bei RT inkubiert, wobei sich die CaPO<sub>4</sub>-Kristalle unter Einschluß der DNS bilden. Die Größe der Kristalle ist dabei kritisch für die Effizienz der Transfektion, da größere Kristalle schlechter von den Zellen aufgenommen werden. Die Lösung wurde nun vorsichtig ins Medium zu den Zellen pipettiert. Nach 4–6 h wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem vorgewärmtem Medium gewaschen und frisches Medium mit FKS und AB/AM zugegeben. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet.

Die Transfektionen zur Bestimmung der CAT-Enzymaktivität wurden aufgrund der geringeren benötigten Gesamtproteinmenge auch in 6-Loch Platten durchgeführt. Für eine Vertiefung dieser Größe (35 mm Durchmesser) wurde der oben beschriebene Transfektionsansatz halbiert.

Für die meisten Plasmide wurden Standardkonzentrationen für die jeweiligen Experimente ermittelt. Die Ausnahme machten Titrations- und Konkurrenzexperimente.

*Standard-Plasmidkonzentrationen für ein 60 mm Schälchen:*

Reporterplasmide allg.	1 µg
pSLIIBCAT	2 µg
Expressionsplasmide für Effektorproteine	1 µg
GFP- und Luciferaseplasmide	1 µg

Abweichende Konzentrationen werden zusammen mit den jeweiligen Experimenten aufgeführt.

*Abschätzung der Transfektionseffizienz*

Mit der CaPO<sub>4</sub>-DNS-Kopräzipitationsmethode ließen sich je nach transfizierter Zelllinie Transfektionseffizienzen von 10-15% (85HG66) bis zu 90% (HEK293) der Zellen erzielen.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und der Expressionsaktivität der Zellen wurde in jedem Ansatz ein Luciferase-Expressionsplasmid (pGL3-RFB oder RSV-Luc, vgl. Abb. 8, S. 26 und Kap. 6.1.2.) kotransfiziert und anschließend die Luciferaseaktivität in den Zellysaten gemessen. Auf die Luciferase-Messungen wird im Zusammenhang mit den verschiedenen Reporter-Gen-Analysen genauer eingegangen.

Darüber hinaus wurde in ausgewählten Ansätzen ein GFP-Expressionsplasmid (pFred143, vgl. Kap. 6.1.2. und Abb. 8, S. 27) kotransfiziert. Die GFP-Expression ermöglichte die Abschätzung der Transfektionseffizienz (in diesem Falle in Prozent der Zellen, die transfiziert wurden) etwa 12 h nach der Transfektion. Die transfizierten Zellen zeigten nach Anregung des GFP unter UV-Licht im Fluoreszenzmikroskop grüne Fluoreszenz (für eine detaillierte Beschreibung vgl. Kap. 6.2.4.3.).

#### **6.2.1.4.2. Das FuGENE™6-Transfektionsreagenz**

Transfektionen für Lokalisationsstudien, bei denen nur ein einzelnes Plasmid in die Zellen eingebracht werden sollte, wurden mit dem FuGENE™6-Transfektionsreagenz von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, daß die Gesamtmenge an Plasmid, die benötigt wird, geringer ist als bei der CaPO<sub>4</sub>-Methode. Darüber hinaus müssen die Zellen nicht gewaschen werden, das Reagenz verbleibt auf den Zellen. Die Transfektionseffizienz der Methode liegt zwischen etwa 15% (85HG66) und 90% (HEK293) und damit deutlich höher als mit der CaPO<sub>4</sub>-Methode. Allerdings ist FuGENE™6 weniger geeignet für das Einbringen einer größeren Menge an DNS, beispielsweise bei Titrationen von Plasmidkonzentrationen (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg, persönliche Mitteilung).

Über das Prinzip der DNS-Aufnahme in die Zellen liegen von Roche Molecular Biochemicals keine Informationen vor. Das gewünschte Plasmid wurde in einem Volumen von 0,5 bis 10 µl in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. In ein zweites Gefäß wurden pro 35 mm Schälchen, das transfiziert werden sollte, 100 µl serumfreies Medium (DMEM) gegeben. Pro µg DNS wurden 3 µl FuGENE™6-Transfektionsreagenz in das Medium gegeben und nach 5 min RT zu der DNS pipettiert. Der Mix wurde 15 min bei RT inkubiert und dann auf die Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen fixiert und die Immunfluoreszenz durchgeführt (Kap. 6.2.3.5.) bzw. an lebenden Zellen die GFP-Lokalisation festgestellt.

#### *Behandlung der Zellen mit Leptomycin B (LMB)*

LMB wurde zur Inaktivierung des aktiven Kernexports über den CRM1 vermittelten Transportweg eingesetzt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit FuGENE™6 transfiziert und 24 h im Brutschrank inkubiert. LMB wurde in einer Endkonzentration von 10 nM ins Medium gegeben und die Zellen weiter bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden mikroskopische Aufnahmen gemacht.

#### **6.2.2. Molekularbiologische Standardmethoden**

Standardmethoden wurden prinzipiell angewendet wie in Sambrook et al. beschrieben (Sambrook, J., Fritsch, E. F., et al., 1989). Im folgenden werden diese daher nur aufgeführt, wenn die Anwendung modifiziert wurde oder in Sambrook et al. nicht beschrieben ist.

### 6.2.2.1. Ligation von DNS-Stücken mit „sticky ends“

Dazu wurde der Rapid Ligation Kit von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, benutzt. Insgesamt wurden 200 ng DNS in einem Verhältnis von Vektor zu Insert 1:4 eingesetzt.

#### *Standardansatz:*

3 µl DNS (200 ng)

2 µl Verdünnungspuffer

1 µl Ligase

10 µl 2x Ligationspuffer, ad 20 µl mit A. d.

Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Transformation durchgeführt.

### 6.2.2.2. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNS

Zur Amplifikation der verwendeten Plasmide wurde der *E. coli* Stamm XL1blue verwendet. Die kompetenten Zellen wurden von der Firma Stratagene bezogen.

#### *Hitzeschock-Methode*

Für die Transformation wurden superkompetente oder kompetente XL1-blue Epicurian Coli® verwendet. Die kompetenten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und zu jedem Transformationsansatz (entsprechend 50 µl Bakteriensuspension) wurde 1 µl 1,42 M β-Mercaptoethanol (Stratagene) gegeben. Nach 10 min auf Eis wurden 1-2 µl Plasmid-DNS, z. B. aus einem Ligationsansatz oder auch zur Retransformation von Plasmiden, zugegeben. Nach 15-20 min auf Eis wurden die Bakterienzellen einem Hitzeschock im Wasserbad unterzogen (45 sek bei 42°C, dabei werden die Plasmide von den Zellen aufgenommen) und erneut 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium (Vollmedium, Stratagene) wurde der Ansatz für 30-60 min in einem 37°C-Schüttler inkubiert. In dieser Zeit werden die neu erhaltenen Gene, insbesondere die Resistenzgene, von den Bakterien exprimiert. 100 bzw. 250 µl der Bakteriensuspension wurden dann auf LB/Amp-Platten ausgestrichen und ü/N in den 37°C Brutschrank gestellt. Der restliche Ansatz konnte bei 4°C aufbewahrt werden. Am folgenden Tag waren Einzelkolonien auf den Platten gewachsen, die, wie in Kapitel 6.2.2.3. für die Plasmidkleinpräparation beschrieben, angeimpft und dann für weitere Analysen verwendet werden konnten.

#### *Elektrotransformation*

Die zu transformierende DNS wurde in einer Butanolfällung von Salzen gereinigt und in A. d. aufgenommen. 50 µl elektrokompenter Zellen wurden auf Eis mit der DNS vermischt. Im Gene Pulser (Einstellung 2,49 kV, 400 Ohm, 25 µF) bekamen die Zellen einen kurzen Elektropuls. Sofort wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellen weiter behandelt wie für die Hitzeschock-Methode bereits beschrieben. Die Transformationseffizienz lag dabei um den Faktor 10 bis 100 höher als bei der Hitzeschocktransformation.

### *Herstellung von Glycerinkulturen*

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 10 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur 5 min bei 5000xg zentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml Einfriermedium resuspendiert. Nach 30 min bei RT, in denen das Glycerin in die Zellen diffundiert, wurden die Bakterien bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### *6.2.2.3. Isolierung von Plasmiden aus E. coli*

##### *Plasmidgroßpräparation*

Die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNS aus 300–500 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurde mit dem Plasmid-Maxi-Kit der Firma Qiagen, Hilden, im wesentlichen entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die so isolierte DNS wurde für Transfektionen und alle Standardmethoden der Molekularbiologie eingesetzt.

Das Prinzip der Methode beruht auf alkalischer Lyse der Bakterien, danach wird die Plasmid-DNS an eine Anionenaustauscher-Säule gebunden. RNS oder Proteine werden nicht gebunden. Die DNS wird dann mit einem Hochsalzpuffer wieder eluiert.

Dazu wurde zunächst eine Vorkultur der gewünschten Bakterien angesetzt, aus einer Glycerinkultur bzw. von einer LB-Agarplatte wurde in 3 ml LB-Flüssigmedium mit 3  $\mu\text{l}$  Ampicillin-Lösung eine Impföse der Kultur bzw. eine Kolonie der Platte angeimpft. Nach etwa 8 h Wachstum bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 220 rpm im Schüttelinkubator wurde mit 1 ml dieser Vorkultur die Hauptkultur (350 ml LB-Flüssigmedium mit 350  $\mu\text{l}$  Ampicillin-Lösung) angeimpft und ü/N bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 120 rpm im Schikanekolben vermehrt. Dann wurden die Kulturen 15 min bei 5000xg zentrifugiert und das Bakterienpellet in 10 ml kaltem Resuspensionspuffer P1 homogenisiert. Die Suspension wurde in einen 50 ml Zentrifugenbecher überführt. Dann wurden 10 ml Lysispuffer P2 dazugegeben, vorsichtig gemischt und die Suspension 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse wurde mit 10 ml Neutralisationspuffer P3 gestoppt, die Lysate 20 min auf Eis inkubiert und anschließend bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 20000xg für 30 min zentrifugiert. Die Plasmide befinden sich im Überstand, das Pellet enthält die Reste der Bakterienzellen mit der genomischen DNS. Um möglichst alle Proteinreste zu entfernen, die später die Säulen verstopfen und die DNS verunreinigen würden, wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und nochmals 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 20000xg zentrifugiert. Der nun klare, gelbliche Überstand wurde auf die mit 15 ml QBT-Puffer äquilibrierten Qiagen-Säulen gegeben. Nach Durchtropfen dieser Lösung wurden die Säulen zweimal mit Waschpuffer QC gewaschen und die Plasmide dann mit 15 ml Elutionspuffer QF in 50 ml Falcon-Röhrchen eluiert. Es folgte eine Fällung der DNS durch Zugabe von 0,7 Teilen (v/v) Isopropanol und 20 min Zentrifugation bei 5000xg und  $4^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde verworfen und das Plasmidpellet mit 10 ml 70% EtOH von Salzen gewaschen, nochmals 10 min wie beschrieben zentrifugiert und getrocknet. Die Aufnahme der DNS erfolgte in 500-1000  $\mu\text{l}$  A. d.

Die Konzentration der erhaltenen Plasmidlösung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNS entsprechen nach Sambrook et al. bei 260 nm einer Absorption von 1 (Sambrook, J., Fritsch, E. F, et al., 1989). Zur Überprüfung der

Reinheit des Materials wurde die Absorption zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gebildet. Dieser sollte bei reinen Präparationen ohne Proteinkontaminationen zwischen 1,8 und 2 liegen.

Die Ausbeute lag je nach Größe des Plasmids und seiner Kopienzahl in den Bakterienzellen zwischen 0,2-2 µg/µl Plasmidlösung. 0,5 µg der Präparation wurden in je mindestens zwei unterschiedlichen Ansätzen mit Restriktionsenzymen so geschnitten (Sambrook, J., Fritsch, E. F. et al., 1989), daß die präparierten Plasmide deutlich voneinander unterschieden werden konnten und so sichergestellt war, korrektes Material zu haben. Außerdem wurde neben den Restriktionen auch eine ungeschnittene Plasmidprobe auf ein Agarosegel aufgetragen (Sambrook, J., Fritsch, E. F. et al., 1989), um den Anteil an superspiralisierter DNS zu prüfen. War dieser Anteil größer als etwa 10-20%, so mußte die Funktionalität der Präparation für Transfektionen kritisch geprüft werden.

#### *Plasmidkleinpräparation*

Das Prinzip der Methode sowie das verwendete Puffersystem wurde bereits für die Plasmidgroßpräparation beschrieben. Allerdings wird hier Plasmid-DNS hier in kleinerem Maßstab präpariert, was das Verfahren deutlich beschleunigt und die simultane Aufarbeitung einer großen Menge an Proben zu Testzwecken erlaubt.

Die entsprechende Bakterienkolonie wurde in 3 ml LB mit Ampicillin angeimpft und ü/N bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Aus dieser Kultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die Bakterien 5 min bei 4500xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse wurden 200 µl Puffer P2 dazugegeben und die Reaktion nach 5 min bei RT mit 150 µl Puffer P3 gestoppt. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde die Suspension 15 min bei 35000xg zentrifugiert. Die Plasmide aus dem Überstand wurden mit Ethanol gefällt (Sambrook, J., Fritsch, E. F. et al., 1989) und das DNS-Pellet in 30-50 µl A. d. oder TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute lag bei etwa 0,5 µg/µl Plasmidlösung.

#### *6.2.2.4. Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen*

##### *„Freeze Squeeze“*

Diese Methode wurde nach Tautz und Renz modifiziert (Tautz, D. und Renz, M., 1982). Mit dem Skalpell wurde das DNS-haltige Gelstück aus dem Agarosegel möglichst genau ausgeschnitten und für 30 min in Freeze-Squeeze-Puffer bei RT inkubiert. Das Stückchen wurde dann in ein vorbereitetes 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses enthielt im Boden ein kleines, mit einem silikonisierten Glasfilterstück (Whatman GF/C, Durchmesser 2,5 cm) gestopftes Loch. Das Gefäß wurde mit dem Agarosestück in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in ein größeres Eppendorf-Gefäß ohne Deckel gestellt und sofort bei 35000xg und RT 10 min zentrifugiert. Das Agarosestück taut während der Zentrifugation auf, die Gelmatrix löst sich und gibt die DNS frei. Diese fließt durch das Loch in das Auffanggefäß, während die Reste der Gelmatrix von dem Glasfilter zurückgehalten werden. Die DNS in der erhaltenen Lösung wurde mit Ethanol gefällt (Sambrook, J., Fritsch, E. F. et al., 1989) und in

einem der zu erwartenden Konzentration angemessenen Volumen an A. d. oder TE-Puffer aufgenommen. Zur Mengenabschätzung wurde ein Aliquot erneut in einem Agarosegel geprüft. Die Ausbeute lag zwischen 70% und 95%.

#### *Qiaquick Gel Extraction Kit*

Bei der Extraktion von DNS aus Agarosegelen einer Konzentration von mehr als einem Prozent Agarose wurde der Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Damit können DNS-Stücke einer Größe von 100 bp bis 10 kb eluiert werden. Das entsprechende Gelstück wurde ausgeschnitten und 10 min bei 50°C in Qiagen-Solubilisierungspuffer inkubiert, wobei sich die Gelmatrix in Folge des pH-Wertes auflöst. Es wird ein Volumen Isopropanol hinzugefügt und das Gemisch über eine Säule gegeben. Diese bindet selektiv die DNS. RNS und Proteine werden heruntergewaschen und schließlich die DNS in A. d. oder TE-Puffer eluiert. Die Ausbeute an DNS lag dabei zwischen 80 und 90%.

#### *6.2.2.5. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)*

Diese Methode wurde angewendet, um selektiv ein bestimmtes Stück aus einer DNS-Sequenz zu amplifizieren. Dabei werden zwei gegenläufige Primer eingesetzt, die jeweils als Startpunkt für die Polymerase dienen und so gleichzeitig je ein Ende des Amplifikats definieren. Die Menge des Produktes steigt dabei exponentiell mit jedem Amplifikationszyklus. Mittels der PCR amplifizierte DNS wurde für Klonierungen verwendet. Benutzt wurde der High Fidelity PCR Kit von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, gemäß den Angaben im dortigen Protokoll für einen Ansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Reaktionen wurden im Thermocycler (Perkin Elmer Cetus Gene Amp 9600) durchgeführt.

#### *Standardzyklus:*

- |    |             |  |
|----|-------------|--|
| 1. | 2 min 94°C  | Einmaliges Denaturieren der DNS-Matrize                                    |
| 2. | 15 sek 94°C | Denaturieren   |
| 3. | 30 sek 55°C | Anheften der Primer an der Matrize   |
| 4. | 3 min 72°C  | Elongation der Primer komplementär zur Matrize durch die Polymerase        |
| 5. | 7 min 72°C  | Abschließende Kettenverlängerung evtl. unvollständig gebliebener Fragmente |

Abkühlen der Reaktion auf 4°C. Die Schritte zwei bis vier wurden in 25 Zyklen wiederholt.

#### *6.2.2.6. Sequenzierung von DNS-Molekülen*

Das Grundprinzip dieser Sequenzanalyse ist die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger, F. et al., 1977). Für die Sequenzreaktion wurde über eine Säule oder in einer Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigte DNS verwendet, da Proteinbestandteile, freie Nukleotide oder



Oligonukleotide sowie Ethanolreste die Sequenzreaktion stören würden. Verwendet wurde der Kit von ABI.

Jedes Reaktionsgefäß enthielt dabei jeweils nur einen 5'- oder 3'-Primer, da die Sequenzreaktion eine Art „Einzelstrang-PCR“ darstellt. Im Terminator-Mix sind neben den dNTP's auch ddNTP's enthalten, an denen keine Strangverlängerung mehr erfolgen kann. Während des Elongationsschrittes erfolgt somit ein Kettenabbruch, der statistisch an jeder Position im zu sequenzierenden Molekül erfolgen kann. Die so markierten DNS-Fragmente verschiedener Länge können später bei ihrer Auftrennung auf Polyacrylamidgelen mittels eines Laserstrahls erkannt und unterschieden werden. Als Startpunkte für die Polymerase dienen die eingesetzten 3'- und 5'-Primer.

*Sequenzreaktion:*

Terminator Mix (ABI)	8 µl
Template-DNS	0,1-0,5 µg
Primer (Stock 2 µM)	3,2 pmol, d. h. 1,6 µl
A. d.	ad 20 µl

Die Reaktionen wurden im Thermocycler (Perkin Elmer Cetus Gene Amp 9600) in 25 Zyklen von Schritt eins bis drei unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 10 sek 96°C Denaturieren
2. 15 sek 50°C Anheften des Primers
3. 4 min 60°C Elongation des Primers

Abkühlen der Reaktion auf 4°C.

Anschließend wurde eine EtOH-Fällung durchgeführt, das DNS-Pellet wurde lyophilisiert und konnte bis zum Gellauf bei -20°C eingefroren werden.

Für den Lauf wurden die Proben in einem denaturierenden Mix aus 4 µl Formamid und 1 µl Auftragspuffer resuspendiert, zwei Minuten auf 90°C erhitzt und dann auf Eis aufbewahrt. Zur Auftrennung wurde ein 6%iges Acrylamidgel verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Computer unter Verwendung der ABI-Software.

### **6.2.3. Biochemische und immunologische Methoden**

#### *6.2.3.1. Bestimmung der Gesamtproteinmenge von Zellysaten*

Die Herstellung der Zellysate ist im Zusammenhang mit den jeweils anschließenden Reportergeranalysen beschrieben. Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge in Zellysaten wurde der BCA-Proteintestkit von Pierce verwendet. Er beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{+2}$  zu  $\text{Cu}^{+1}$  durch Protein in alkalischer Lösung (Biured-Reaktion). Die Reduktion ist an eine Farbreaktion gekoppelt, wobei zwei Moleküle BCA (Bichinonic Acid) einen Chelatkomplex mit einem Kupferkation bilden. Der Komplex ist photometrisch bei 562 nm messbar und die

Farbintensität ist über einen weiten Bereich (5-2000 µg Protein pro ml Lösung) direkt proportional zur Proteinmenge.

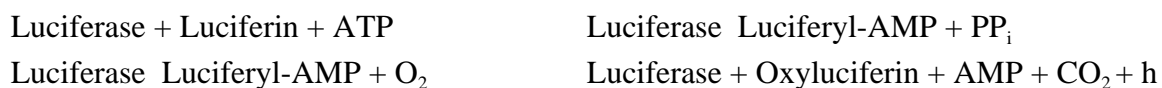
Der Test wurde in 96-Loch Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Probenvolumen der Zellysate betrug je nach Zelllinie 5-10 µl und wurde mit A. d. immer auf 10 µl aufgefüllt. Es wurden Doppelbestimmungen von jedem Lysat durchgeführt. Zur Auswertung wurde auf jeder Platte eine Eichkurve erstellt, wobei jeweils 10 µl von sechs verschiedenen Verdünnungen einer BSA-Lösung (Stammlösung im Kit enthalten; Konzentrationen der Verdünnungen zwischen 2 und 0,0625 mg/ml) in Doppelansätzen bestimmt wurden.

Zu allen Proben und Standardwerten wurden 200 µl Farbreagenz pipettiert, die sich aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil Lösung B zusammensetzte. Der Ansatz wurde 30-60 min bei 37°C inkubiert und dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Eichkurve wurde am Computer erstellt (Programm CA-Cricket Graph III oder Microsoft Excel 98) und ordnet über die Steigung der Regressionsgeraden jeder gemessenen optischen Dichte eine bestimmte Proteinkonzentration zu.

Für die nachfolgenden Tests (z. B. Luciferasebestimmung oder CAT-Test) wurden die Messwerte auf 50 µg Gesamtproteinmenge standardisiert. Für die Bestimmung der CAT-Umsatzraten erschien dies nicht sinnvoll, da 100% Umsatz einen theoretischen Maximalwert darstellen. Daher sind die CAT-Umsatzraten (in Prozent) nur innerhalb eines Experimentes und einer Zelllinie miteinander vergleichbar, die verschiedenen Zelllinien jedoch nur unter Zuhilfenahme der relativen Größe der Induktionen (vgl. Kap. 6.2.3.3. und 3.2.1.).

#### 6.2.3.2. *Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Zellysaten*

Luciferasen sind Enzyme, die ein Substrat, das Luciferin, unter der Emission von Licht umsetzen. Die hier verwendete Luciferase ist die „Firefly-Luciferase“. Das Prinzip der Reaktion von de Wet ist die Oxidation von Luciferin durch die Luciferase mit Hilfe von Energie (de Wet, J. R. et al., 1987). Dabei wird Licht der Wellenlänge 562 nm frei. Es werden folgende Reaktionen katalysiert:



In der vorliegenden Arbeit wurde die Luciferase-Expression als Maß für die Transfektionseffizienz bestimmt. Das *luciferase*-Gen stand unter der Kontrolle eines vom eigentlichen Testsystem unabhängigen Promotors, RFB oder RSV (vgl. pGL3-RFB und pRSVluc, Kap. 6.1.2.). Die Luciferase-Aktivität sollte sich für jeden Ansatz pro Zelllinie bei einer vergleichbaren Transfektionsrate auch in der gleichen Größenordnung bewegen.

Darüber hinaus konnten Rückschlüsse auf die Expressionsaktivität der Zellen gezogen werden. Hat z. B. ein in die Zelle eingebrachtes Plasmid oder ein davon exprimiertes Protein toxische Einflüsse auf die Zellen, so wird auch die Luciferase-Expression sinken. In jedem Ansatz wurde ein Luciferase-Plasmid kotransfiziert. Wichen die Luciferase-Meßwerte in einem Experiment

(sowohl in den Doppelbestimmungen als auch in den verschiedenen Transfektionsansätzen) um mehr als 50% voneinander ab, so fand das Experiment keine Berücksichtigung.

Die Herstellung der Zellysate ist im Zusammenhang mit den jeweils anschließenden Reporteranalysen beschrieben. Die Menge an Lysat, die zur Luciferasebestimmung eingesetzt wurde, variierte je nach Zelllinie und gesamten Probenvolumen zwischen 10 und 50  $\mu$ l und ist in den folgenden Kapiteln jeweils gesondert aufgeführt. Verwendet wurde der Luciferase-Assay-Kit von Promega, Madison, USA. Zur Vorbereitung wurden 7 mg lyophilisiertes Luciferase-Substrat in 10 ml Luciferase Assay Puffer gelöst.

Das entsprechende Probenvolumen wurde in ein 5 ml Sarstedt-Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden in ein Luminometer (AutoLumat LB 953, Berthold) gestellt. Das Gerät injiziert zu jeder Probe automatisch 100  $\mu$ l Substrat und mißt die Lichtemission über einen Zeitraum von sechs Sekunden. Der Messwert ergibt sich in relativen Licht Einheiten (RLU). Die Werte wurden auf 50  $\mu$ g Gesamtprotein standardisiert.

#### *6.2.3.3. Bestimmung der CAT-Menge in Zellysaten (CAT-ELISA)*

Zur Quantifizierung der CAT-Proteinmenge in Zellysaten wurde der CAT-ELISA von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivierung der CAT-Expression durch verschiedene Effektoren in unterschiedlichen Zelllinien ermittelt. Um Zelllinien unabhängig von schwankenden Einflußfaktoren wie der Transfektionseffizienz oder ihrer individuellen Expressionsstärke vergleichen zu können, wurde die relative Größe der „Induktion“ definiert. Die Induktion ergibt sich rechnerisch aus dem Quotient eines Wertes mit aktivierter CAT-Expression zu einem nicht-aktiviertem Basalwert, gibt also die n-fache-Steigerung der CAT-Expression durch den Effektor wieder. Der Basalwert ergibt sich aus dem jeweiligen experimentellen Ansatz und wird im Zusammenhang mit den einzelnen Experimenten dargelegt. Die Induktion gibt keine Rohdaten an und wird nur zum Vergleich verschiedener Zelllinien verwendet.

Im Gegensatz dazu wird die Stimulation der CAT-Expression durch den jeweiligen Effektor innerhalb einer Zelllinie als Transaktivierung durch den Effektor bezeichnet.

#### *Zellernte*

Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in jedes 60 mm Schälchen 1 ml CAT Lysis-Puffer gegeben. Dieser lysiert die Zellmembran, nicht jedoch die Kernmembran. Nach 30 min Inkubation bei RT konnte das Proteinlysate abgenommen werden, wobei Kerne und Membranreste im Schälchen verblieben. Das Lysat wurde 10 min bei 4°C und 35000xg zentrifugiert und permanent auf Eis gehalten.

#### *CAT-ELISA*

Der CAT-ELISA basiert auf dem „Sandwich-Prinzip“, bei dem das zu detektierende Antigen von zwei spezifischen Antikörpern gebunden wird. Die Zellysate wurden in entsprechenden Verdünnungen und einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l in eine mit polyklonalem anti CAT

Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Im zweiten Schritt wurde das dort gebundene CAT-Protein von einem Digoxigenin-markierten anti CAT Antikörper gebunden. Das Digoxigenin wurde letztlich von einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper gebunden. 45 min nach Zugabe des Peroxidasesubstrates ABTS, das von der Peroxidase in ein grünes Reaktionsprodukt umgesetzt wird, wurde in einem ELISA-Reader (BioRad, München) die Absorption bei 405 nm bestimmt. Wie schon für die Proteinbestimmung beschrieben (Kap. 6.2.3.1.), wurden die gemessenen optischen Dichten der Proben mit Hilfe einer Eichkurve, in diesem Fall erstellt aus Lösungen bestimmter CAT-Konzentrationen, ausgewertet. Die Menge an CAT (in pg) wurde auf 50 µg Gesamtprotein standardisiert. Zur Auswertung wurden nur die Experimente herangezogen, bei denen die Abweichung parallel ermittelter Werte weniger als 50% voneinander betrug.

#### *6.2.3.4. Bestimmung der CAT-Aktivität (enzymatischer CAT-Test)*

In diesem Test wurde nicht die absolute Menge an CAT-Protein (Kap. 6.2.3.3.), sondern die Aktivität des CAT-Enzymes gemessen. Aufgrund des dadurch gegebenen Verstärkungseffektes ist diese Art der Messung wesentlich sensitiver als der bereits gezeigte CAT-ELISA. Obgleich in der Literatur beschrieben wurde, daß die Sensitivität beider Systeme vergleichbar ist (Reifel-Miller, A. E. et al., 1996), konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Induktionen ermittelt werden, bei denen die Feststellung des Basalwertes der Expression im nicht-induzierten System essentiell ist. Dies gelang für schwach exprimierende Zellen bzw. für Zellen mit geringer Transfektionseffizienz nur im enzymatischen Test. Die Induktionen unterschieden sich nicht in Abhängigkeit zur Auswertungsmethode. In einem Experiment zur Tat-Transaktivierung (vgl. Kap. 3.3.1.) wurde die Aktivierung der LTR-gesteuerten CAT-Expression durch die Anwesenheit von Tat in HEK293-Zellen mit dem ELISA auf 5,4 bestimmt, im enzymatischen Test auf 5,3. Da jedoch die gesamte benötigte Proteinmenge im enzymatischen Test geringer ist, wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit alle Transfektionen auf die Auswertung mit dem enzymatischen Test umgestellt. Welcher Test Verwendung fand, ist im Ergebnisteil, sofern Rohdaten angegeben werden, vermerkt.

Da die Daten aus dem funktionellen Test am Computer unter Verwendung spezieller Software (Molecular Dynamics, Krefeld) digital ausgewertet wurden, kann auch hier von einer sensitiveren Bestimmung der Expression als in der photometrischen Messung im CAT-ELISA ausgegangen werden.

#### *Zellernte*

48 h nach der Transfektion wurde das Medium aus den Schälchen abgenommen und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden pro 60 mm Schälchen mit 1 ml TNE-Puffer 5 min bei 37°C oder 10 min bei RT inkubiert. Dann konnten sie im Puffer aus dem Schälchen gespült und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt werden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min 10000xg RT) pelletiert und in 100-300 µl 0,25 M Tris/HCl (pH 7,4) aufgenommen. Da dieser Puffer kein Detergenz enthielt, wurden integrale Membranproteine

nicht mit isoliert. Das Puffervolumen richtete sich nach der Größe des verwendeten Transfektionsschälchens und der Zelllinie. Astrozytomzelllinien wachsen in Kultur weniger konfluent und langsamer als die verwendeten Kontrollzelllinien. Die Astrozytomzellen wurden deshalb in einer geringeren Puffermenge aufgenommen.

Die Zellen wurden durch dreimaliges abwechselndes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im 37°C-Wärmeblock aufgeschlossen. Um Membranbestandteile und weitere größere Strukturen aus dem Lysat zu entfernen, wurden die Proben anschließend 10 min bei 4°C und 35000xg zentrifugiert. Diese Lysate konnten nun direkt für die einzelnen Messungen benutzt oder auch über einen längeren Zeitraum bei -80°C gelagert werden.

#### *Bestimmung der CAT-Aktivität in der Dünnschichtchromatographie*

CAT ist ein bakterielles Enzym, das das Antibiotikum Chloramphenicol durch Übertragung einer Acetylgruppe aus Acetyl-CoA inaktiviert. Im Experiment können acetyliertes und nicht acetyliertes Chloramphenicol in einer Dünnschicht-Chromatographie (DC) getrennt werden und so die Umsatzrate (entsprechend der Menge an acetyliertem Substrat von der Gesamtmenge an Substrat) bestimmt werden. Diese ist der Menge an CAT in einem bestimmten Zellysat direkt proportional und dient somit als Maß für die CAT-Expression, die ihrerseits z. B. Aufschluß über eine Promotoraktivität in einem bestimmten zellulären Kontext gibt.

Der Test wurde mit Hilfe des FAST CAT Kits (Molecular Probes, Oregon, USA) durchgeführt. Der Kit enthält fluoreszenzmarkiertes Chloramphenicol. Die DC-Platte wurde nach dem Lauf eingescannt und die Signale am Computer quantifiziert (vgl. Kap. 6.2.4.2.).

Das für den Test eingesetzte Volumen an Zellysat richtete sich nach der Transfektionseffizienz (abgeschätzt anhand der GFP- und Luciferase-Expression), der Zelllinie und der Inkubationsdauer. Für eine ü/N Inkubation wurden zwischen 0,5 und 20 µg Gesamtprotein eingesetzt. Das Volumen wurde mit 0,25 M Tris/HCl pH 7,4 auf 65 µl pro Test in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen eingestellt. Die Proben wurden im Wärmeblock bei 37°C mit 5 µl des Substrates Chloramphenicol (lyophilisiert im Kit enthalten, wurde in 1 ml Methanol gelöst) 5 min vorinkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Acetyl-CoA-Lösung gestartet. Die Endkonzentration an Acetyl-CoA betrug 9 mM. Die Ansätze wurden bei 37°C 2 h bis ü/N im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von 1 ml kaltem Ethylacetat gestoppt, 20 sek gevortext und die beiden Phasen durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 35000xg getrennt. In der Ethylacetatphase befand sich das extrahierte Chloramphenicol, das in ein frisches Gefäß überführt und lyophilisiert wurde. Nach Resuspension in 10 µl Ethylacetat wurden die Proben auf eine DC-Platte aufgetragen. Die Platte wurde aufrecht in eine DC-Kammer mit 200 ml Laufmittel (Chloroform:Methanol 85:15) gestellt. Die Dauer des Laufes betrug 35-45 min.

Anschließend wurde die Platte getrocknet und im FluroImager („Storm“, Molecular Dynamics) unter Verwendung der Molecular Dynamics-Software (Image Quant v1.2) eingescannt. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Substrat war ein 1-deoxychloramphenicol, das nur eine acetylierbare Position enthält. Daher ergibt sich bei der Auswertung nur eine acetylierte Form des Substrates, was die Quantifizierung wesentlich erleichtert. Unmodifiziertes

Chloramphenicol enthält dagegen zwei acetylierbare Positionen. Damit ergeben sich nach der DC drei verschiedene Banden; einfach acetyliertes Chloramphenicol zeigt unterschiedliches Laufverhalten je nachdem an welcher Position die Acetylierung stattfand, eine weitere Bande repräsentiert doppelt acetyliertes Chloramphenicol.

Acetyliertes und nicht acetyliertes Substrat wurden quantifiziert und die Umsatzrate berechnet. Zur Analyse mit dem Computer (Programm Image Quant v1.2) vgl. Kapitel 6.2.4.2..

Es wurde darauf geachtet, daß der CAT-Umsatz im uninduzierten Wert zwischen 1% und 3% lag, der induzierte Wert sollte 50% nicht überschreiten. Dann ist eine Sättigung der Messung erreicht und CAT-Umsatz und tatsächliche Menge an CAT im Proteinlysate stehen nicht mehr in einem linearen Verhältnis zueinander. Dies sei an einem Beispiel demonstriert (Tab. 7). Die hier gezeigte CAT-Messung zur Transaktivierungskapazität von Tat (Kap. 3.3.1.) wurde mit HEK293-Proteinlysaten durchgeführt. Alle vier Ansätze wurden parallel in Doppelbestimmung gemessen und 1 h 10 min inkubiert. Obwohl mit 5 µg 50% weniger Lysat eingesetzt wurden, ist der CAT-Umsatz nur 16% geringer als im Ansatz mit 10 µg Gesamtprotein. Die Messung mit 10 µg ist somit nicht zu berücksichtigen.

<b>HEK293</b>	CAT Umsatz (%)	Proteinmenge (µg)	Induktion
pHIV npsLTRCAT+pcTat	50,3	10	<b>14</b>
pHIV npsLTRCAT	3,6	10	
pHIV npsLTRCAT+pcTat	42,3	5	<b>21,2</b>
pHIV npsLTRCAT	2,0	5	

**Tab. 7:** Ein Beispiel zur Sättigung der CAT-Messung im funktionellen Test.

#### 6.2.3.5. *Indirekte Immunfluoreszenz*

Um die Expression von in dieser Arbeit verwendeten Effektorplasmiden und die Lokalisation von Rev und Rev-Mutanten auf Einzelzellebene nachzuweisen, wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

Die Zellen wurden in 35 mm Kulturschälchen ausgesät und am nächsten Tag unter Verwendung des FuGENE™6-Transfektionsreagenz mit den gewünschten Expressionsplasmiden transfiziert (vgl. Kap. 6.2.1.4.2.). Nach 24 h wurden die Zellen zweimal mit PBS (RT) gewaschen und mit 3,7% Formalin in PBS 10-20 min bei 37°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum mit PBS gewaschen und mit PBS + 0,1% NP-40 7 min bei 37°C permeabilisiert. Die Zellen konnten nun bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in PBS aufbewahrt werden.

In der Immunfluoreszenz werden Proteine auf Einzelzellebene mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Diese primären Antikörper werden dann von sekundären Antikörpern gebunden, an die eine Markierung, z. B. ein Fluoreszenzfarbstoff, zum Nachweis des gewünschten Proteins gekoppelt ist. Um Reaktionen des zweiten Antikörpers mit anderen Strukturen der Zelle auszuschließen und den unspezifischen Hintergrund der jeweiligen Zelllinie beurteilen zu können, wurden die Zellen als Negativkontrolle auch jeweils nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Im Kulturschälchen wurden daher zwei Areale abgegrenzt, indem die Zellen um diese Areale herum mit einem Wattestäbchen entfernt und das Schälchen dort trockengerieben wurde. Dann wurden diese „Grenzen“ mit einem Fettstift nachgezogen, so daß die Areale einzeln mit den verschiedenen Lösungen inkubiert werden konnten, ohne daß die Lösungen sich vermischten.

Der in dieser Arbeit verwendete Rev-Antikörper (#29994) wurde aus der Testblutung acht eines immunisierten Kaninchens gewonnen. Der Antikörper wurde in PBS 1:200 verdünnt und etwa 100 µl dieser Lösung auf das erste Areal gegeben, auf das zweite wurde PBS gegeben. Die Schälchen wurden 40 min bei 37°C inkubiert und dann zweimal mit PBS gewaschen. Dazu wurde viel PBS hineingegeben und sofort wieder abgeschüttet. Es folgten zwei 10minütige Waschschrte mit PBS unter leichtem Schütteln. Die Inkubation beider Areale mit dem zweiten Antikörper (Ziege, anti-Kaninchen, markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3, 1:200 in PBS) erfolgte ebenfalls für 40 min bei 37°C. Danach wurde viermal in PBS gewaschen wie schon beschrieben. Im letzten Waschschrte wurde der DNS-Farbstoff Hoechst 33342 in einer Verdünnung von 1:5000 dazugegeben. Dadurch werden spezifisch die Kerne angefärbt, die so für die Lokalisationsstudien leicht vom Zytoplasma abzugrenzen sind.

Die Zellen konnten in PBS aufbewahrt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden (Kap. 6.2.4.3.).

## **6.2.4. Computeranalytik und Software**

### **6.2.4.1. Statistische Analysen**

Statistische Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad PRISM®, v2.0b, Software, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA, durchgeführt. Um zu bestimmen, ob sich zwei Ergebnisgruppen signifikant voneinander unterscheiden, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ist der errechnete p-Wert  $< 0,01$ , unterscheiden sich die Ergebnisgruppen signifikant voneinander.

Für die einzelnen Ergebnisgruppen wurde geprüft, ob die Einzelwerte einer Gauß'schen Normalverteilung entsprechen. Dazu wurde die Kolmogorov-Smirnov-Distanz berechnet. Je näher sie gegen Null geht, desto genauer entspricht die Werteverteilung einer idealen Gauß-Verteilung. Dabei ist es nicht möglich, die Gauß-Verteilung für eine Ergebnisgruppe mit weniger als vier Werten zu berechnen. Ab einer Wertemenge von etwa 12 können aussagekräftige Daten berechnet werden.

#### *6.2.4.2. Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen*

Das für den funktionellen CAT-Test verwendete Substrat 1-deoxychloramphenicol ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY FL (Molecular Probes, Oregon, USA) markiert. Dieser emittiert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 503 nm Licht der Wellenlänge 512 nm. Zur Quantifizierung der Signale wurde der FluoroImager („Storm“) der Firma Molecular Dynamics, Krefeld, verwendet. Die Chromatographieplatten wurden mit Hilfe eines blauen Lasers eingescannt, wobei darauf geachtet wurde, daß die Signale nicht im Sättigungsbereich des Scanners lagen. Unter Verwendung der Image Quant Software v1.2 wurden die einzelnen Signale quantifiziert und um ihren lokalen Hintergrund berichtigt. Unter Verwendung von Microsoft-Excel v6.0 bzw. 98 wurden die Signalstärken von nichtacetyliertem und acetyliertem Substrat berechnet und der Prozentsatz acetylierten Substrates vom Gesamtsubstrat berechnet. Der so ermittelte Substratumsatz ist im Rahmen dieser Arbeit als CAT-Umsatz in Prozent angegeben.

#### *6.2.4.3. Mikroskopie und Auswertung der Lokalisationsstudien*

Zur Auswertung der GFP-Expression und für die Lokalisationsstudien mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde ein Zeiss Axiovert 135 TV Mikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen, benutzt. Es wurde mit 100facher Vergrößerung für die Übersichtsaufnahmen bzw. 320facher Vergrößerung für die Lokalisationsstudien gearbeitet. Zum Nachweis der unterschiedlichen Fluoreszenzen wurden verschiedene Filter verwendet (Zeiss Filterset 14). Die Anregungswellenlänge von GFP beträgt 493 nm, für den DNS-Farbstoff Hoechst 33342 357 nm und für Cyanine3 568 nm. Dieser Fluoreszenzfarbstoff war an den sekundären Antikörper gekoppelt, der für die Immunfluoreszenz verwendet wurde.

Die Aufnahmen wurden unter Verwendung der IPLab Spectrum 3.2.4. Software (Sanalytics, USA) gemacht. Es wurde darauf geachtet, nicht in den Sättigungsbereich des CCD-Detektors zu gelangen und jeweils gleiche Belichtungszeiten für die Lokalisationsstudien und die zugehörigen Negativkontrollen zu wählen. Die Bildbearbeitung wurde ebenfalls mit Hilfe der IPLab Software durchgeführt. Dazu wurden repräsentative Bildausschnitte gewählt, der Kontrast korrigiert und die Bilder dann als PICT Format in ein entsprechendes Grafikprogramm exportiert (Adobe Photoshop 5.0, Adobe Systems, USA, oder Claris Works 5.0, Claris Corporation, USA). Dort wurden die gezeigten Abbildungen zusammengefügt.

#### *6.2.4.4. Sonstiges*

Tabellenkalkulationen und Eichkurven wurden mit Microsoft-Excel, v6.0 bzw. 98, oder CA-Cricket Graph III durchgeführt. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden ebenfalls unter Verwendung von Microsoft-Excel 98 berechnet. Grafiken wurden mit ClarisWorks 5.0 (Claris Corporation, USA) oder Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems, USA) erstellt und bearbeitet.



## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	das Nukleotid Adenosin bzw. die Aminosäure Alanin
AB/AM	Antibiotika/Antimykotika Lösung
Abb.	Abbildung
Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
A. d.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ADC	AIDS dementia complex, AIDS Demenz Komplex
Ag	Antigen
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome, erworbenes Immunschwäche Syndrom
Amp.	Ampicillin
As	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinonic acid
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	das Nukleotid Cytosin bzw. die Aminosäure Cystein
CA	virales Kapsidprotein
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CD4	Oberflächen-Glykoprotein der Immunglobulinsuperfamilie
CMV	Zytomegalie Virus
CRM1	humaner Kernexportfaktor (auch Exportin 1)
CRS	cis-acting repressor sequence
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CTD	Carboxy-terminale Domäne (der RNS-Polymerase II)
CTL	cytotoxic T-lymphocyt, zytotoxische T-Lymphozyten
CTP	Cytosintriphosphat
D	Asparaginsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAse	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
F	Phenylalanin
FKS	Fötale Kälberserum
G	das Nukleotid Guanin bzw. die Aminosäure Glycin

g	Gramm
<i>g</i>	relative Zentrifugalbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein aus <i>Aequorea victoria</i>
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
h	Stunde
HAART	highly active antiretroviral therapy, Kombinationstherapie zur Behandlung HIV-infizierter Patienten
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hfs	human flanking sequence
HIV	human immunodeficiency virus, humanes Immunschwäche Virus
HIVD	HIV-Demenz
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie Virus
I	Isoleucin
Il	Interleukin
IN	virale Integrase
INS	inhibitory sequences, Instabilitätssequenzen
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
K	Lysin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
L	Leucin
LMB	Leptomycin B
Lsg.	Lösung
LTR	long terminal repeat
M	molar, im Zusammenhang mit Aminosäuren Methionin
MA	virales Matrixprotein
MHC	major histocompatibility complex, Oberflächenrezeptor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
$\mu$ l	Mikroliter
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
N	Asparagin
NaAc	Natriumacetat
NC	virales Nukleokapsidprotein
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NOS	nukleoläres Lokalisationssignal
NPC	nuclear pore complex, Kernpore
Nt.	Nukleotid(e)
O.D.	Optische Dichte
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
P	Prolin
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion

---

PIC	pre-integration complex, Prä-Integrationskomplex von HIV
PK	Proteinkinase
Pos.	Position
PR	virale Protease
R	Arginin
RFB	Reilly-Finkel-Biskis murines Leukämievirus
RLU	relative light unit, relative Licht-Einheit (der Luciferasemessung)
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RNS-PII	RNS-Polymerase II
RRE	rev responsive element
RSV	Rous sarcoma virus
RT	Raumtemperatur und reverse Transkriptase
S	Serin
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SIV	simian immunodeficiency virus, Immundefizienzvirus des Affen
SLIIB	stem loop IIB
sog.	sogenannt(e)
SU	virales Oberflächenprotein, gp120
SV40	simian virus 40
T	das Nukleotid Thymin bzw. die Aminosäure Threonin
Tab.	Tabelle
TAR	trans-activating response element
Taq	Thermus aquaticus
TDR <sub>rev</sub>	Überbegriff für Rev-Mutanten im Bereich der NES
TGF	transforming growth factor, transformierender Wachstumsfaktor
TM	virales Transmembranprotein, gp41
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Trishydroxyaminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	units (Enzymeinheiten)
UV	Ultraviolettes Licht
ü/N	über Nacht
V	Valin
vgl.	vergleiche
v/v	Verhältnisangabe Volumen zu Volumen
W	Tryptophan
w/v	Verhältnisangabe Gewicht zu Volumen
WHO	world health organisation
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E. und Trono, D.**, 1994; *Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain*. Cell, **76** 853-864.
2. **Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. und Berger, E. A.**, 1996; *CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1*. Science, **272** (5270): 1955-8.
3. **Amado, R. G., Mitsuyasu, R. T. und Zack, J. A.**, 1999; *Gene therapy for the treatment of AIDS: animal models and human clinical experience*. Front Biosci, **4** D468-75.
4. **Arrigo, S. J. und Chen, I. S.**, 1991; *Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs*. Genes Dev, **5** (5): 808-19.
5. **Bachand, F., Yao, X. J., Hrimech, M., Rougeau, N. und Cohen, E. A.**, 1999; *Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor*. J Biol Chem, **274** (13): 9083-91.
6. **Bagasra, O., Khalili, K., Seshamma, T., Taylor, J. P. und Pomerantz, R. J.**, 1992; *TAR-independent replication of human immunodeficiency virus type 1 in glial cells*. J Virol, **66** (12): 7522-8.
7. **Bagasra, O., Lavi, E., Bobroski, L., Khalili, K., Pestaner, J. P., Tawadros, R. und Pomerantz, R. J.**, 1996; *Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry*. Aids, **10** (6): 573-85.
8. **Barbosa, P. und Kneass, Z.**, 1998; *Molecular biology of HIV*. Clin Podiatr Med Surg, **15** (2): 189-202.
9. **Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. und Montagnier, L.**, 1983; *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, **220** (4599): 868-71.
10. **Bednarik, D. P. und Folks, T. M.**, 1992; *Mechanisms of HIV-1 Latency*. AIDS, **6** (1): 3-16.
11. **Benko, D. M., Robinson, R., Solomin, L., Mellini, M., Felber, B. K. und Pavlakis, G. N.**, 1990; *Binding of trans-dominant mutant Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 to the cis-acting Rev-responsive element does not affect the fate of viral mRNA*. New Biol, **2** (12): 1111-22.
12. **Berthold, E. und Maldarelli, F.**, 1996; *cis-acting elements in human immunodeficiency virus type 1 RNAs direct viral transcripts to distinct intranuclear locations*. J Virol, **70** (7): 4667-82.
13. **Bigner, D. D., Bigner, S. H., Ponten, J., Westermarck, B., Mahaley, M. S., Ruoslahti, E., Herschman, H., Eng, L. F. und 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.

14. **Bischoff, F. R. und Ponstingl, H.**, 1991; *Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1*. Nature, **354** (6348): 80-2.
15. **Boe, S. O., Bjorndal, B., Rosok, B., Szilvay, A. M. und Kalland, K. H.**, 1998; *Subcellular localization of human immunodeficiency virus type 1 RNAs, Rev, and the splicing factor SC-35*. Virology, **244** (2): 473-82.
16. **Bogerd, H. und Greene, W. C.**, 1993; *Dominant negative mutants of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus type I Rev fail to multimerize in vivo*. J Virol, **67** (5): 2496-502.
17. **Bogerd, H. P., Echarri, A., Ross, T. M. und 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.
18. **Bond, V. C., Huang, M. B., Person, B., Hairston, R., Ye, X. Y. und Saltarelli, M.**, 1997; *Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein on reporter gene and host T-cell gene expression*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), **43** (7): 995-1005.
19. **Borg, K. T., Favaro, J. P., Arrigo, S. J. und Schmidt, M.**, 1999; *Activation of a cryptic splice donor in human immunodeficiency virus type-1*. J Biomed Sci, **6** (1): 45-52.
20. **Brack-Werner, R.**, 1999; *Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis [editorial]*. Aids, **13** (1): 1-22.
21. **Brack-Werner, R., Kleinschmidt, A., Ludvigsen, A., Mellert, W., Neumann, M., Herrmann, R., Khim, M. C., Burny, A., Muller-Lantzsch, N., und Stavrou, D.**, 1992; *Infection of human brain cells by HIV-1: restricted virus production in chronically infected human glial cell lines*. Aids, **6** (3): 273-85.
22. **Brice, P. C., Kelley, A. C. und Butler, P. J.**, 1999; *Sensitive in vitro analysis of HIV-1 Rev multimerization*. Nucleic Acids Res, **27** (10): 2080-5.
23. **Bukrinsky, M. und Adzhubei, A.**, 1999; *Viral protein R of HIV-1 [In Process Citation]*. Rev Med Virol, **9** (1): 39-49.
24. **Buonomo, S. B., Michienzi, A., De Angelis, F. G. und Bozzoni, I.**, 1999; *The Rev protein is able to transport to the cytoplasm small nucleolar RNAs containing a Rev binding element*. Rna, **5** (8): 993-1002.
25. **Cai, Z., Schools, G. P. und Kimelberg, H. K.**, 2000; *Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression*. Glia, **29** (1): 70-80.
26. **Chan, D. C. und Kim, P. S.**, 1998; *HIV entry and its inhibition*. Cell, **93** (5): 681-4.
27. **Charpentier, B., Stutz, F. und Rosbash, M.**, 1997; *A dynamic in vivo view of the HIV-1 Rev-RRE interaction*. J Mol Biol, **266** (5): 950-62.
28. **Chen, D., Fong, Y. und Zhou, Q.**, 1999; *Specific interaction of Tat with the human but not rodent P-TEFb complex mediates the species-specific Tat activation of HIV-1 transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, **96** (6): 2728-2733.

29. **Cheng-Mayer, C., Weiss, C., Seto, D. und Levy, J. A.**, 1989; *Isolates of human immunodeficiency virus type 1 from the brain may constitute a special group of the AIDS virus.* Proc Natl Acad Sci USA, **86** 8575-8579.
30. **Chiodi, F., Fuerstenberg, S., Gidlund, M., Asjo, B. und Fenyo, E. M.**, 1987; *Infection of brain-derived cells with the human immunodeficiency virus.* J Virol, **61** (4): 1244-7.
31. **Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. und Sodroski, J.**, 1996; *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates.* Cell, **85** (7): 1135-48.
32. **Chun, T. W., Davey, R. und Ostrowski, M.**, 2000; *Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of HAART.* 7th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, California
33. **Chun, T. W. und Fauci, A. S.**, 1999; *Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, **96** (20): 10958-61.
34. **Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., und Rouzioux, C.**, 1986; *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.* Science, **233** (4761): 343-6.
35. **Cohen, E. A., Subbramanian, R. A. und Gottlinger, H. G.**, 1996; *Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis.* Curr Top Microbiol Immunol, **214** 219-35.
36. **Cohen, S. S., Li, C., Ding, L., Cao, Y., Pardee, A. B., Shevach, E. M. und Cohen, D. I.**, 1999; *Pronounced acute immunosuppression in vivo mediated by HIV tat challenge [In Process Citation].* Proc Natl Acad Sci U S A, **96** (19): 10842-7.
37. **Cole, J. L., Gehman, J. D., Shafer, J. A. und Kuo, L. C.**, 1993; *Solution oligomerization of the rev protein of HIV-1: implications for function.* Biochemistry, **32** (44): 11769-75.
38. **Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D. und Baltimore, D.**, 1998; *HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes.* Nature, **391** 397-401.
39. **Conant, K., Garzino-Demo, A., Nath, A., McArthur, J. C., Halliday, W., Power, C., Gallo, R. C. und Major, E. O.**, 1998; *Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia.* Proc Natl Acad Sci U S A, **95** (6): 3117-21.
40. **Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. und Tsien, R. Y.**, 1995; *Understanding, improving and using green fluorescent proteins.* Trends Biochem Sci, **20** (11): 448-55.
41. **Cujec, T. P., Okamoto, H., Fujinaga, K., Meyer, J., Chamberlin, H., Morgan, D. O. und Peterlin, B. M.**, 1997; *The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II.* Genes Dev, **11** (20): 2645-57.
42. **Cullen, B. R.**, 1986; *Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism.* Cell, **46** 973-982.

43. **Cullen, B. R.**, 1998; *HIV-1 auxiliary proteins: Making connections in a dying cell*. Cell, **93** 685-692.
44. **D'Agostino, D. M., Felber, B. K., Harrison, J. E. und 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*. Mol Cell Biol, **12** (3): 1375-86.
45. **Daly, T. J., Doten, R. C., Rennert, P., Auer, M., Jaksche, H., Donner, A., Fisk, G. und Rusche, J. R.**, 1993; *Biochemical characterization of binding of multiple HIV-1 Rev monomeric proteins to the Rev responsive element*. Biochemistry, **32** (39): 10497-505.
46. **Davis, L. E., Hjelle, B. L., Miller, V. E., Palmer, D. L., Llewellyn, A. L., Merlin, T. L., Young, S. A., Mills, R. G., Wachsmann, W. und Wiley, C. A.**, 1992; *Early viral brain invasion in iatrogenic human immunodeficiency virus infection*. Neurology, **42** (9): 1736-9.
47. **Dayton, A. I.**, 1996; *The Rev Axis of HIV-1 and Its Associated Host Cofactors: A Viral Window onto the Workings of Eukaryotic Posttranskriptional RNA Processing*. Journal of Biomedical Science, (3): 69-77.
48. **de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. und Subramani, S.**, 1987; *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. Mol Cell Biol, **7** (2): 725-37.
49. **Dettenhofer, M. und Yu, X. F.**, 1999; *Proline residues in human immunodeficiency virus type 1 p6(Gag) exert a cell type-dependent effect on viral replication and virion incorporation of Pol proteins*. J Virol, **73** (6): 4696-704.
50. **Dewhurst, S., Sakai, K., Bresser, J., Stevenson, M., Evinger-Hodges, M. J. und Volsky, D. J.**, 1987; *Persistent productive infection of human glial cells by human immunodeficiency virus (HIV) and by infectious molecular clones of HIV*. J Virol, **61** (12): 3774-82.
51. **Ding, S. F., Noronha, J. und Joshi, S.**, 1998; *Co-packaging of sense and antisense RNAs: a novel strategy for blocking HIV-1 replication*. Nucleic Acids Res, **26** (13): 3270-8.
52. **Duan, L., Oakes, J. W., Ferraro, A., Bagasra, O. und Pomerantz, R. J.**, 1994; *Tat and rev differentially affect restricted replication of human immunodeficiency virus type 1 in various cells*. Virology, **199** (2): 474-8.
53. **Ellis, R. J., Hsia, K., Spector, S. A., Nelson, J. A., Heaton, R. K., Wallace, M. R., Abramson, I., Atkinson, J. H., Grant, I. und McCutchan, J. A.**, 1997; *Cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus type 1 RNA levels are elevated in neurocognitively impaired individuals with acquired immunodeficiency syndrome*. HIV Neurobehavioral Research Center Group [see comments]. Ann Neurol, **42** (5): 679-88.
54. **Emerman, M. und Malim, M. H.**, 1998; *HIV-1 regulatory / accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology*. Science, **280** 1880-1884.
55. **Ensoli, B., Buonaguro, L. und Barillari, G.**, 1993; *Release, uptake and effects of extracellular human immunodeficiency virus type-1 tat protein on cell growth and viral transactivation*. J Virol, **67** 277-287.
56. **Enting, R. H., Hoetelmans, R. M., Lange, J. M., Burger, D. M., Beijnen, J. H. und Portegies, P.**, 1998; *Antiretroviral drugs and the central nervous system [editorial]*. Aids, **12** (15): 1941-55.

57. **Fauci, A. S.**, 1993; *Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy*. Science, **262** (5136): 1011-8.
58. **Felber, B. K., Drysdale, C. M. und Pavlakis, G. N.**, 1990; *Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein*. J Virol, **64** (8): 3734-41.
59. **Felber, B. K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T. und Pavlakis, G. N.**, 1989; *rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, **86** (5): 1495-9.
60. **Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. und Berger, E. A.**, 1996; *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]*. Science, **272** (5263): 872-7.
61. **Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Luhrmann, R. und Rautmann, G.**, 1994; *Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA*. Embo J, **13** (17): 4105-12.
62. **Fischer, U., Pollard, V. W., Luhrmann, R., Teufel, M., Michael, M. W., Dreyfuss, G. und Malim, M. H.**, 1999; *Rev-mediated nuclear export of RNA is dominant over nuclear retention and is coupled to the Ran-GTPase cycle*. Nucleic Acids Res, **27** (21): 4128-34.
63. **Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. und Mattaj, I. W.**, 1997; *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals [see comments]*. Cell, **90** (6): 1051-60.
64. **Fouts, D. E., True, H. L., Cengel, K. A. und 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.
65. **Frankel, A. D. und Young, J. A.**, 1998; *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, **67** 1-25.
66. **Frech, K., Danescu-Mayer, J. und Werner, T.**, 1997; *A novel method to develop highly specific models for regulatory units detects a new LTR in GenBank which contains a functional promoter*. J Mol Biol, **270** (5): 674-87.
67. **Freed, E. O.**, 1998; *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle*. Virology, **251** (1): 1-15.
68. **Fridell, R. A., Bogerd, H. P. und Cullen, B. R.**, 1996; *Nuclear export of late HIV-1 mRNAs occurs via a cellular protein export pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, **93** (9): 4421-4.
69. **Fridell, R. A., Fischer, U., Luhrmann, R., Meyer, B. E., Meinkoth, J. L., Malim, M. H. und Cullen, B. R.**, 1996; *Amphibian transcription factor IIIA proteins contain a sequence element functionally equivalent to the nuclear export signal of human immunodeficiency virus type 1 Rev*. Proc Natl Acad Sci U S A, **93** (7): 2936-40.
70. **Friedler, A., Zakai, N., Karni, O., Friedler, D., Gilon, C. und Loyter, A.**, 1999; *Identification of a nuclear transport inhibitory signal (NTIS) in the basic domain of HIV-1 Vif protein*. J Mol Biol, **289** (3): 431-7.
71. **Fujimura, R. K., Bockstahler, L. E., Goodkin, K., Werner, T., Brack-Werner, R. und Shapshak, P.**, 1996; *Neuropathology and Virology of HIV Associated Dementia*. Rev Med Virol, **6** (3): 141-150.



72. **Fujinaga, K., Cujec, T. P., Peng, J., Garriga, J., Price, D. H., Grana, X. und Peterlin, B. M.**, 1998; *The ability of positive transcription elongation factor B to transactivate human immunodeficiency virus transcription depends on a functional kinase domain, cyclin T1, and Tat.* J Virol, **72** (9): 7154-9.
73. **Gabuzda, D. H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W. A. und Sodroski, J.**, 1992; *Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes.* J Virol, **66** (11): 6489-95.
74. **Gallo, R. C., Sarin, P. S. und Gelmann, E. P.**, 1983; *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* Cell, **220** 865.
75. **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. und Hahn, B. H.**, 1999; *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes [see comments].* Nature, **397** (6718): 436-41.
76. **Garnier, L., Bowzard, J. B. und Wills, J. W.**, 1998; *Recent advances and remaining problems in HIV assembly.* Aids, **12 Suppl A** S5-16.
77. **Gimbel, W., Schmidt, J., Brack-Werner, R., Luz, A., Strauss, P. G., Erfle, V. und Werner, T.**, 1996; *Molecular and pathogenic characterization of the RFB osteoma virus: lack of oncogene and induction of osteoma, osteopetrosis, and lymphoma.* Virology, **224** (2): 533-8.
78. **Glass, J. D., Fedor, H., Wesselingh, S. L. und McArthur, J. C.**, 1995; *Immunocytochemical quantitation of human immunodeficiency virus in the brain: correlations with dementia.* Ann Neurol, **38** (5): 755-62.
79. **Goh, W. C., Rogel, M. E., Kinsey, C. M., Michael, S. F., Fultz, P. N., Nowak, M. A., Hahn, B. H. und Emerman, M.**, 1998; *HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo.* Nat Med, **4** (1): 65-71.
80. **Goldstein, G.**, 1996; *HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine.* Nat Med, **2** (9): 960-4.
81. **Gorry, P. R., Howard, J. L., Churchill, M. J., Anderson, J. L., Cunningham, A., Adrian, D., McPhee, D. A. und Purcell, D. F. J.**, 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): 352-361.
82. **Goto, T., Nakai, M. und Ikuta, K.**, 1998; *The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1.* Micron, **29** (2-3): 123-38.
83. **Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R.**, 1977; *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.* J Gen Virol, **36** (1): 59-74.
84. **Groothuis, D. R. und Levy, R. M.**, 1997; *The entry of antiviral and antiretroviral drugs into the central nervous system [see comments].* J Neurovirol, **3** (6): 387-400.
85. **Guy, B., Kieny, M. P., Riviere, Y., LePeuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L. und Ledcocq, J. P.**, 1987; *HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product.* Nature (London), **330** 266-269.
86. **Hahn, B.**, 1994; *Textbook of AIDS medicine.* Williams and Wilkings Verlag

87. **Hamm, T. E., Rekosh, D. und Hammarskjold, M. L.**, 1999; *Selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 mutants that are resistant to inhibition by the transdominant negative RevM10 protein.* J Virol, **73** (7): 5741-7.
88. **Hammerschmid, M., Palmeri, D., Ruhl, M., Jaksche, H., Weichselbraun, I., Bohnlein, E., Malim, M. H. und Hauber, J.**, 1994; *Scanning mutagenesis of the arginine-rich region of the human immunodeficiency virus type 1 Rev trans activator.* J Virol, **68** (11): 7329-35.
89. **Han, P., Brown, R. und Barsoum, J.**, 1991; *Transactivation of heterologous promoters by HIV-1 tat.* Nucleic Acids Res, **19** (25): 7225-9.
90. **Hao, H. N. und Lyman, W. D.**, 1999; *HIV infection of fetal human astrocytes: the potential role of a receptor-mediated endocytic pathway.* Brain Res, **823** (1-2): 24-32.
91. **Harrigan, P. R., Whaley, M. und Montaner, J. S.**, 1999; *Rate of HIV-1 RNA rebound upon stopping antiretroviral therapy.* Aids, **13** (8): F59-62.
92. **Harrington, R. D. und Geballe, A. P.**, 1993; *Cofactor requirement for human immunodeficiency virus type 1 entry into a CD4-expressing human cell line.* J Virol, **67** (10): 5939-47.
93. **Heaphy, S., Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M. und Skinner, M. A.**, 1990; *HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem- loop structure located within the Rev response element region.* Cell, **60** (4): 685-93.
94. **Heger, P., Rosorius, O., Hauber, J. und Stauber, R. H.**, 1999; *Titration of cellular export factors, but not heteromultimerization, is the molecular mechanism of trans-dominant HTLV-1 rex mutants.* Oncogene, **18** (28): 4080-90.
95. **Heguy, A.**, 1997; *Inhibition of the HIV Rev transactivator : A new target for therapeutic intervention.* Front Biosci, **2** d283-97.
96. **Henderson, B. R. und 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.
97. **Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H. und Johnson, P. R.**, 1989; *An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2.* Nature, **339** (6223): 389-92.
98. **Hofman, F. M., Dohadwala, M. M., Wright, A. D., Hinton, D. R. und Walker, S. M.**, 1994; *Exogenous tat protein activates central nervous system-derived endothelial cells.* J Neuroimmunol, **54** (1-2): 19-28.
99. **Hope, T. J., Huang, X. J., McDonald, D. und 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.
100. **Hope, T. J., Klein, N. P., Elder, M. E. und Parslow, T. G.**, 1992; *trans-Dominant Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Rev Occurs Through Formation of Inactive Protein Complexes.* J Virol, **66** (4): 1849-1855.
101. **Hrimech, M., Yao, X. J., Bachand, F., Rougeau, N. und Cohen, E. A.**, 1999; *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection.* J Virol, **73** (5): 4101-9.

102. **Hua, J., Caffrey, J. J. und Cullen, B. R.**, 1996; *Functional consequences of natural sequence variation in the activation domain of HIV-1 Rev*. Virology, **222** (2): 423-9.
103. **Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. und Gorlich, D.**, 1997; *The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus*. Embo J, **16** (21): 6535-47.
104. **Jones, K. A.**, 1997; *Taking a new TAK on tat transactivation [comment]*. Genes Dev, **11** (20): 2593-9.
105. **Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A., Kehlenbach, A., Guan, T. und Gerace, L.**, 1999; *A role for RanBP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export [In Process Citation]*. J Cell Biol, **145** (4): 645-57.
106. **Kerkau, T., Bacik, I., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., Hunig, T., Schimpl, A. und Schubert, U.**, 1997; *The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules*. J Exp Med, **185** (7): 1295-305.
107. **Kingsman, S. M. und Kingsman, A. J.**, 1996; *The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression*. Eur J Biochem, **240** (3): 491-507.
108. **Kjems, J. und Askjaer, P.**, 1999; *HIV-1 Rev and its cellular partners*. Advances in Pharmacology,
109. **Kjems, J., Calnan, B. J., Frankel, A. D. und Sharp, P. A.**, 1992; *Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev*. Embo J, **11** (3): 1119-29.
110. **Kjems, J., Frankel, A. D. und Sharp, P. A.**, 1991; *Specific regulation of mRNA splicing in vitro by a peptide from HIV-1 Rev*. Cell, **67** (1): 169-78.
111. **Klein, R. S., Williams, K. C., Alvarez-Hernandez, X., Westmoreland, S., Force, T., Lackner, A. A. und Luster, A. D.**, 1999; *Chemokine receptor expression and signaling in macaque and human fetal neurons and astrocytes: implications for the neuropathogenesis of AIDS*. J Immunol, **163** (3): 1636-46.
112. **Kleinschmidt, A., Neumann, M., Moller, C., Erfle, V. und Brack-Werner, R.**, 1994; *Restricted expression of HIV1 in human astrocytes: molecular basis for viral persistence in the CNS*. Res Virol, **145** (3-4): 147-53.
113. **Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M. D., Martin, M. A. und Orenstein, J. M.**, 1990; *The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release*. J Virol, **64** 621-629.
114. **Kolson, D. L., Lavi, E. und Gonzalez-Scarano, F.**, 1998; *The effects of human immunodeficiency virus in the central nervous system*. Adv Virus Res, **50** 1-47.
115. **Kruman, II, Nath, A. und Mattson, M. P.**, 1998; *HIV-1 protein tat induces apoptosis of hippocampal neurons by a mechanism involving caspase activation, calcium overload, and oxidative stress [In Process Citation]*. Exp Neurol, **154** (2): 276-88.
116. **Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M. und Horinouchi, S.**, 1999; *Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region*. Proc Natl Acad Sci U S A, **96** (16): 9112-7.

117. **Kutay, U., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Mattaj, I. W. und Gorlich, D.**, 1997; *Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex*. *Embo J*, **16** (6): 1153-63.
118. **Lamb, R. A. und Pinto, L. H.**, 1997; *Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B virus have ion channel activities in the viral life cycles?* *Virology*, **229** (1): 1-11.
119. **Le Gall, S., Erdtmann, L., Benichou, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L., Benarous, R., Heard, J.-M. und Schwartz, O.**, 1998; *Nef interacts with the  $\mu$  subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules*. *Immunity*, **8** 483-495.
120. **Lee, S., Neumann, M., Stearman, R., Stauber, R., Pause, A., Pavlakis, G. N. und Klausner, R. D.**, 1999; *Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*. *Mol Cell Biol*, **19** (2): 1486-97.
121. **Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V. und Pardee, A. B.**, 1995; *Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein*. *Science*, **268** (5209): 429-31.
122. **Littman, D. R.**, 1998; *Chemokine receptors: Keys to AIDS pathogenesis*. *Cell*, **93** 677-680.
123. **Lopez, A. J.**, 1998; *Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation*. *Annu Rev Genet*, **32** 279-305.
124. **Ludvigsen, A., Werner, T., Gimbel, W., Erfle, V. und Brack-Werner, R.**, 1996; *Down-modulation of HIV-1 LTR activity by an extra-LTR nef gene fragment*. *Virology*, **216** (1): 245-51.
125. **Ludwig, E., Silberstein, F. C., van Empel, J., Erfle, V., Neumann, M. und Brack-Werner, R.**, 1999; *Diminished rev-mediated stimulation of human immunodeficiency virus type 1 protein synthesis is a hallmark of human astrocytes [In Process Citation]*. *J Virol*, **73** (10): 8279-89.
126. **Ma, M. und Nath, A.**, 1997; *Molecular determinants for cellular uptake of Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 in brain cells*. *J Virol*, **71** 2495-2499.
127. **Madore, S. J., Tiley, L. S., Malim, M. H. und Cullen, B. R.**, 1994; *Sequence requirements for Rev multimerization in vivo*. *Virology*, **202** (1): 186-94.
128. **Maldarelli, F., Martin, M. A. und Strebel, K.**, 1991; *Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation*. *J Virol*, **65** (11): 5732-43.
129. **Malim, M. H., Bohnlein, S., Hauber, J. und 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.
130. **Malim, M. H. und Cullen, B. R.**, 1991; *HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency*. *Cell*, **65** (2): 241-8.
131. **Malim, M. H. und Cullen, B. R.**, 1993; *Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes*. *Mol Cell Biol*, **13** (10): 6180-9.
132. **Malim, M. H., Hauber, J., Fenrick, R. und Cullen, B. R.**, 1988; *Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes*. *Nature*, **335** (6186): 181-3.
133. **Malim, M. H., McCarn, D. F., Tiley, L. S. und Cullen, B. R.**, 1991; *Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain*. *J Virol*, **65** (8): 4248-54.

134. **Malim, M. H., Tiley, L. S., McCarn, D. F., Rusche, J. R., Hauber, J. und Cullen, B. R.**, 1990; *HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans- activator to its RNA target sequence*. Cell, **60** (4): 675-83.
135. **Mancebo, H. S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D. und Flores, O.**, 1997; *P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro*. Genes Dev, **11** (20): 2633-44.
136. **Mann, D. A., Mikaelian, I., Zimmel, R. W., Green, S. M., Lowe, A. D., Kimura, T., Singh, M., Butler, P. J., Gait, M. J. und Karn, J.**, 1994; *A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression*. J Mol Biol, **241** (2): 193-207.
137. **Margottin, F., Bour, S. P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. und Benarous, R.**, 1998; *A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif*. Mol Cell, **1** (4): 565-74.
138. **Marsh, J. W.**, 1999; *The numerous effector functions of Nef*. Arch Biochem Biophys, **365** (2): 192-8.
139. **Mattaj, I. W. und Englmeier, L.**, 1998; *Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase*. Annu Rev Biochem, **67** 265-306.
140. **McArthur, J. C., McClernon, D. R., Cronin, M. F., Nance-Sproson, T. E., Saah, A. J., St Clair, M. und Lanier, E. R.**, 1997; *Relationship between human immunodeficiency virus-associated dementia and viral load in cerebrospinal fluid and brain [see comments]*. Ann Neurol, **42** (5): 689-98.
141. **McCune, J., Rabin, L., Feinberg, M., Lieberman, M., Kosak, J., Reyes, G. und IL, W.**, 1988; *Endoproteolytic cleavage of pg160 is required for the activation of human immunodeficiency virus*. Cell, **53** 55-67.
142. **McCune, J. M.**, 1995; *Viral latency in HIV disease*. Cell, **82** (2): 183-8.
143. **Meyer, B. E. und Malim, M. H.**, 1994; *The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm*. Genes Dev, **8** (13): 1538-47.
144. **Mikaelian, I., Krieg, M., Gait, M. J. und Karn, J.**, 1996; *Interactions of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs*. J Mol Biol, **257** (2): 246-64.
145. **Miller, R. J. und Meucci, O.**, 1999; *AIDS and the brain: is there a chemokine connection?* Trends Neurosci, **22** (10): 471-9.
146. **Modrow, S. und Falke, D.**, 1997; *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag
147. **Mukhtar, M., Duke, H., BouHamdan, M. und Pomerantz, R. J.**, 2000; *Anti-human immunodeficiency virus type 1 gene therapy in human central nervous system-based cells: an initial approach against a potential viral reservoir [In Process Citation]*. Hum Gene Ther, **11** (2): 347-59.
148. **Nakaya, T., Iwai, S., Fujinaga, K., Otsuka, E. und Ikuta, K.**, 1997; *Inhibition of HIV-1 replication by targeting the Rev protein*. Leukemia, **11 Suppl 3** 134-7.

149. **Nakaya, T., Iwai, S., Fujinaga, K., Sato, Y., Otsuka, E. und Ikuta, K.**, 1997; *Decoy approach using RNA-DNA chimera oligonucleotides to inhibit the regulatory function of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein.* Antimicrob Agents Chemother, **41** (2): 319-25.
150. **Nakielny, S. und Dreyfuss, G.**, 1997; *Nuclear export of proteins and RNAs.* Curr Opin Cell Biol, **9** (3): 420-9.
151. **Nasioulas, G., Zolotukhin, A. S., Taberner, C., Solomin, L., Cunningham, C. P., Pavlakis, G. N. und Felber, B. K.**, 1994; *Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA.* J Virol, **68** (5): 2986-93.
152. **Neumann, M., Felber, B. K., Kleinschmidt, A., Froese, B., Erfle, V., Pavlakis, G. N. und 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.
153. **Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L. I. und 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.
154. **Niikura, M., Dornadula, G., Zhang, H., Mukhtar, M., Lingxun, D., Khalili, K., Bagasra, O. und Pomerantz, R. J.**, 1996; *Mechanisms of transcriptional transactivation and restriction of human immunodeficiency virus type 1 replication in an astrocytic glial cell.* Oncogene, **13** (2): 313-22.
155. **Nuovo, G. J., Gallery, F., MacConnell, P. und Braun, A.**, 1994; *In situ detection of polymerase chain reaction-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor-alpha RNA in the central nervous system.* Am J Pathol, **144** (4): 659-66.
156. **Palmeri, D. und Malim, M. H.**, 1999; *Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha.* Mol Cell Biol, **19** (2): 1218-25.
157. **Persidsky, Y., Ghorpade, A., Rasmussen, J., Limoges, J., Liu, X. J., Stins, M., Fiala, M., Way, D., Kim, K. S., Witte, M. H., Weinand, M., Carhart, L. und Gendelman, H. E.**, 1999; *Microglial and astrocyte chemokines regulate monocyte migration through the blood-brain barrier in human immunodeficiency virus-1 encephalitis.* Am J Pathol, **155** (5): 1599-611.
158. **Persidsky, Y., Stins, M., Way, D., Witte, M. H., Weinand, M., Kim, K. S., Bock, P., Gendelman, H. E. und Fiala, M.**, 1997; *A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis.* J Immunol, **158** (7): 3499-510.
159. **Piguet, V., Chen, Y.-L., Mangasarian, A., Foti, M., Carpenter, J. L. und Trono, D.**, 1998; *Mechanisms of nef-induced CD4 endocytosis: nef connects CD4 with the  $\mu$  chain of adaptor complexes.* EMBO J, **17** 2472-2481.
160. **Piguet, V. und Trono, D.**, 1999; *The Nef protein of primate lentiviruses.* Rev Med Virol, **9** (2): 111-20.
161. **Pollard, V. W. und Malim, M. H.**, 1998; *The HIV-1 Rev protein.* Annu Rev Microbiol, **52** 491-532.

162. **Pomerantz, R. J., Seshamma, T. und Trono, D.**, 1992; *Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency.* J Virol, **66** (3): 1809-13.
163. **Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G. und Bukrinsky, M.**, 1998; *Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex.* J Biol Chem, **273** (21): 13347-52.
164. **Powell, D. M., Amaral, M. C., Wu, J. Y., Maniatis, T. und Greene, W. C.**, 1997; *HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing.* Proc Natl Acad Sci U S A, **94** (3): 973-8.
165. **Rana, T. M. und Jeang, K. T.**, 1999; *Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA.* Arch Biochem Biophys, **365** (2): 175-85.
166. **Ranga, U., Woffendin, C., Verma, S., Xu, L., June, C. H., Bishop, D. K. und Nabel, G. J.**, 1998; *Enhanced T cell engraftment after retroviral delivery of an antiviral gene in HIV-infected individuals.* Proc Natl Acad Sci U S A, **95** (3): 1201-6.
167. **Ranki, A., Nyberg, M., Ovod, V., Haltia, M., Elovaara, I., Raininko, R., Haapasalo, H. und Krohn, K.**, 1995; *Abundant expression of HIV Nef and Rev proteins in brain astrocytes in vivo is associated with dementia.* Aids, **9** (9): 1001-8.
168. **Rappaport, J., Joseph, J., Croul, S., Alexander, G., Del Valle, L., Amini, S. und Khalili, K.**, 1999; *Molecular pathway involved in HIV-1-induced CNS pathology: role of viral regulatory protein, Tat.* J Leukoc Biol, **65** (4): 458-65.
169. **Ratmeyer, L., Zapp, M. L., Green, M. R., Vinayak, R., Kumar, A., Boykin, D. W. und Wilson, W. D.**, 1996; *Inhibition of HIV-1 Rev-RRE interaction by diphenylfuran derivatives.* Biochemistry, **35** (42): 13689-96.
170. **Re, F., Braaten, D., Franke, E. K. und Luban, J.**, 1995; *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B.* J Virol, **69** (11): 6859-64.
171. **Reddy, T. R., Kraus, G., Suhasini, M., Leavitt, M. C. und Wong-Staal, F.**, 1995; *Identification and mapping of inhibitory sequences in the human immunodeficiency virus type 2 vif gene.* J Virol, **69** (8): 5167-70.
172. **Reifel-Miller, A. E., Conarty, D. M., Schacht, P. S., Birch, K. A., Heath, W. F. und Stramm, L. E.**, 1996; *Comparison of ELISA and TLC for the analysis of promoter activity when using the CAT reporter gene.* Biotechniques, **21** (6): 1033-6.
173. **Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M. und Gorlich, D.**, 1998; *NTF2 mediates nuclear import of Ran.* Embo J, **17** (22): 6587-98.
174. **Richard, N., Iacampo, S. und Cochrane, A.**, 1994; *HIV-1 Rev is capable of shuttling between the nucleus and cytoplasm.* Virology, **204** (1): 123-31.
175. **Romano, G., Massi, D. und Giordano, A.**, 1998; *The standpoint of AIDS research and therapy programs.* Anticancer Res, **18** (4B): 2763-78.
176. **Rottman, J. B., Ganley, K. P., Williams, K., Wu, L., Mackay, C. R. und Ringler, D. J.**, 1997; *Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection.* Am J Pathol, **151** (5): 1341-51.

177. **Rubartelli, A., Poggi, A., Sitia, R. und Zocchi, M. R.**, 1998; *HIV-1 Tat: a polypeptide for all seasons*. Immunol Today, **19** (12): 543-5.
178. **Sabri, F., Tresoldi, E., Di Stefano, M., Polo, S., Monaco, M. C., Verani, A., Fiore, J. R., Lusso, P., Major, E., Chiodi, F. und Scarlatti, G.**, 1999; *Nonproductive human immunodeficiency virus type 1 infection of human fetal astrocytes: independence from CD4 and major chemokine receptors*. Virology, **264** (2): 370-84.
179. **Sakai, H., Furuta, R. A., Tokunaga, K., Kawamura, M., Hatanaka, M. und Adachi, A.**, 1995; *Rev-dependency of expression of human immunodeficiency virus type 1 gag and env genes*. FEBS Lett, **365** (2-3): 141-5.
180. **Sakai, H., Shibata, R., Sakuragi, J., Sakuragi, S., Kawamura, M. und Adachi, A.**, 1993; *Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles*. J Virol, **67** (3): 1663-6.
181. **Saksela, K., Cheng, G. und Baltimore, D.**, 1995; *Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4*. Embo J, **14** (3): 484-91.
182. **Sambrook, J., Fritsch, EF, Maniatis, T.**, 1989; *Molecular cloning-A Laboratory manual*. Cold Spring Harbour,
183. **Sanders, V. J., Pittman, C. A., White, M. G., Wang, G., Wiley, C. A. und Achim, C. L.**, 1998; *Chemokines and receptors in HIV encephalitis*. Aids, **12** (9): 1021-6.
184. **Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.**, 1977; *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, **74** (12): 5463-7.
185. **Sawaya, B. E., Thatikunta, P., Denisova, L., Brady, J., Khalili, K. und Amini, S.**, 1998; *Regulation of TNFalpha and TGFbeta-1 gene transcription by HIV-1 Tat in CNS cells*. J Neuroimmunol, **87** (1-2): 33-42.
186. **Schmid, P., Conrad, A., Syndulko, K., Singer, E. J., Handley, D., Li, X., Tao, G., Fahy-Chandon, B. und Tourtellotte, W. W.**, 1994; *Quantifying HIV-1 proviral DNA using the polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid and blood of seropositive individuals with and without neurologic abnormalities*. J AIDS, **7** (8): 777-88.
187. **Schmidt, J. und Erfle, V.**, 1984; *Elimination of mycoplasmas from cell cultures and establishment of mycoplasma-free cell lines*. Exp Cell Res, **152** (2): 565-70.
188. **Schmitt, K., Daubener, W., Bitter-Suermann, D. und Hadding, U.**, 1988; *A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin*. J Immunol Methods, **109** (1): 17-25.
189. **Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B. K. und Pavlakis, G. N.**, 1997; *Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation*. J Virol, **71** (7): 4892-903.
190. **Schrager, L. K. und D'Souza, M. P.**, 1998; *Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy*. Jama, **280** (1): 67-71.



191. **Schroder, H. C., Ushijima, H., Bek, A., Merz, H., Pfeifer, P. und Muller, W. E. G.**, 1993; *Inhibition of formation of Rev-RRE complex by pyronin Y*. Antiviral Chem. Chemother, **4** 103-109.
192. **Schubert, U., Anton, L. C., Bacik, I., Cox, J. H., Bour, S., Bennink, J. R., Orłowski, M., Strebel, K. und Yewdell, J. W.**, 1998; *CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway*. J Virol, **72** (3): 2280-8.
193. **Schwartz, S., Campbell, M., Nasioulas, G., Harrison, J., Felber, B. K. und Pavlakis, G. N.**, 1992; *Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression*. J Virol, **66** (12): 7176-82.
194. **Schwartz, S., Felber, B. K. und Pavlakis, G. N.**, 1992; *Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein*. J Virol, **66** (1): 150-9.
195. **Seguin, B., Staffa, A. und Cochrane, A.**, 1998; *Control of human immunodeficiency virus type 1 RNA metabolism: role of splice sites and intron sequences in unspliced viral RNA subcellular distribution*. J Virol, **72** (12): 9503-13.
196. **Selby, M. J. und Peterlin, B. M.**, 1990; *Trans-activation by HIV-1 Tat via a heterologous RNA binding protein*. Cell, **62** (4): 769-76.
197. **Selig, L., Pages, J. C., Tanchou, V., Preveral, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L. X., Erdtmann, L., Darlix, J., Benarous, R. und Benichou, S.**, 1999; *Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses*. J Virol, **73** (1): 592-600.
198. **Seshamma, T., Bagasra, O., Trono, D., Baltimore, D. und Pomerantz, R. J.**, 1992; *Blocked early-stage latency in the peripheral blood cells of certain individuals infected with human immunodeficiency virus type 1*. Proc Nat Acad Sci, **89** (11): 10663-10667.
199. **Simon, J. H. und Malim, M. H.**, 1996; *The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes*. J Virol, **70** (8): 5297-305.
200. **Spott, S., Dong, F., Kisters-Woike, B. und Muller-Hill, B.**, 2000; *Dimerisation Mutants of Lac Repressor. II*. J Mol Biol, **296** (2): 673-684.
201. **Stauber, R., Gaitanaris, G. A. und 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.
202. **Stauber, R. H., Afonina, E., Gulnik, S., Erickson, J. und Pavlakis, G. N.**, 1998; *Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells*. Virology, **251** (1): 38-48.
203. **Stauber, R. H. und Pavlakis, G. N.**, 1998; *Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein*. Virology, **252** (1): 126-36.
204. **Stavrou, D., Bise, K., Groeneveld, J., Stocker, U., Kretzschmar, H. A., Keiditsch, E. und Mehraein, P.**, 1989; *Antigenic heterogeneity of human brain tumors defined by monoclonal antibodies*. Anticancer Res, **9** (6): 1489-96.

205. **Stavrou, D., Keiditsch, E., Schmidberger, F., Bise, K., Funke, I., Eisenmenger, W., Kurrle, R., Martin, B. und Stocker, U.**, 1987; *Monoclonal antibodies against human astrocytomas and their reactivity pattern*. J Neurol Sci, **80** (2-3): 205-20.
206. **Stevenson, M.**, 1997; *Molecular mechanisms for the regulation of HIV replication, persistence and latency*. Aids, **11** (Suppl A): S25-33.
207. **Swingler, S., Mann, A., Jacque, J., Brichacek, B., Sasseville, V. G., Williams, K., Lackner, A. A., Janoff, E. N., Wang, R., Fisher, D. und Stevenson, M.**, 1999; *HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages [see comments]*. Nat Med, **5** (9): 997-103.
208. **Szilvay, A. M., Brokstad, K. A., Boe, S. O., Haukenes, G. und Kalland, K. H.**, 1997; *Oligomerization of HIV-1 Rev mutants in the cytoplasm and during nuclear import*. Virology, **235** (1): 73-81.
209. **Szilvay, A. M., Brokstad, K. A., Kopperud, R., Haukenes, G. und Kalland, K. H.**, 1995; *Nuclear export of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocytoplasmic shuttle protein Rev is mediated by its activation domain and is blocked by transdominant negative mutants*. J Virol, **69** (6): 3315-23.
210. **Tan, R. und Frankel, A. D.**, 1994; *Costabilization of peptide and RNA structure in an HIV Rev peptide-RRE complex*. Biochemistry, **33** (48): 14579-85.
211. **Tang, H., Kuhlen, K. L. und Wong-Staal, F.**, 1999; *Lentivirus replication and regulation [In Process Citation]*. Annu Rev Genet, **33** 133-70.
212. **Tautz, D. und Renz, M.**, 1982; *An optimized Freeze-Squeeze method for the recovery of DNA-fragments from agarose gels*. Anal. Biochem., **132** 14-19.
213. **Taylor, J. P., Cupp, C., Diaz, A., Chowdhury, M., Khalili, K., Jimenez, S. A. und Amini, S.**, 1992; *Activation of expression of genes coding for extracellular matrix proteins in Tat-producing glioblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, **89** (20): 9617-21.
214. **Taylor, J. P. und Khalili, K.**, 1994; *Activation of HIV-1 transcription by Tat in cells derived from the CNS: evidence for the participation of NF-kappa B--a review*. Adv Neuroimmunol, **4** (3): 291-303.
215. **Taylor, J. P., Pomerantz, R. J., Oakes, J. W., Khalili, K. und Amini, S.**, 1995; *A CNS-enriched factor that binds to NF-kappa B and is required for interaction with HIV-1 tat*. Oncogene, **10** (2): 395-400.
216. **Thomas, S. L., Hauber, J. und Casari, G.**, 1997; *Probing the structure of the HIV-1 Rev transactivator protein by functional analysis*. Protein Eng, **10** (2): 103-7.
217. **Thomas, S. L., Oft, M., Jaksche, H., Casari, G., Heger, P., Dobrovnik, M., Bevec, D. und Hauber, J.**, 1998; *Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface*. J Virol, **72** (4): 2935-44.
218. **Tiley, L. S., Madore, S. J., Malim, M. H. und Cullen, B. R.**, 1992; *The VP16 transcription activation domain is functional when targeted to a promoter-proximal RNA sequence*. Genes Dev, **6** (11): 2077-87.
219. **Tiley, L. S., Malim, M. H., Tewary, H. K., Stockley, P. G. und Cullen, B. R.**, 1992; *Identification of a high-affinity RNA-binding site for the human immunodeficiency virus type 1*

- Rev protein [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1992 Mar 1;89(5):1997]. Proc Natl Acad Sci U S A, 89 (2): 758-62.*
220. **Tornatore, C., Meyers, K., Atwood, W., Conant, K. und Major, E.**, 1994; *Temporal pattern of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in human fetal astrocytes.* Journal of Virology, **68** (1): 93-102.
221. **Trono, D.**, 1995; *HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast.* Cell, **82** (2): 189-92.
222. **Truant, R. und 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.
223. **Tsien, R. Y.**, 1998; *The green fluorescent protein.* Annu Rev Biochem, **67** 509-44.
224. **Van Ryk, D. I. und Venkatesan, S.**, 1999; *Real-time kinetics of HIV-1 Rev-Rev response element interactions. Definition of minimal binding sites on RNA and protein and stoichiometric analysis.* J Biol Chem, **274** (25): 17452-63.
225. **Veres, G., Junker, U., Baker, J., Barske, C., Kalfoglou, C., Ilves, H., Escaich, S., Kaneshima, H. und Bohnlein, E.**, 1998; *Comparative analyses of intracellularly expressed antisense RNAs as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication.* J Virol, **72** (3): 1894-901.
226. **Vitkovic, L. und Tardieu, M.**, 1998; *Neuropathogenesis of HIV-1 infection. Outstanding questions.* C R Acad Sci III, **321** (12): 1015-21.
227. **Watts, N. R., Misra, M., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., Cheng, N., Trus, B. L., Steven, A. C. und Williams, R. W.**, 1998; *Three-dimensional structure of HIV-1 Rev protein filaments.* J Struct Biol, **121** (1): 41-52.
228. **Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H. und Jones, K. A.**, 1998; *A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA.* Cell, **92** (4): 451-62.
229. **Weiss, J. M., Nath, A., Major, E. O. und Berman, J. W.**, 1999; *HIV-1 Tat induces monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte transmigration across a model of the human blood-brain barrier and up-regulates CCR5 expression on human monocytes.* J Immunol, **163** (5): 2953-9.
230. **Werstuck, G., Zapp, M. L. und Green, M. R.**, 1996; *A non-canonical base pair within the human immunodeficiency virus rev- responsive element is involved in both rev and small molecule recognition.* Chem Biol, **3** (2): 129-37.
231. **Wiley, C. A., Achim, C. L., Christopherson, C., Kidane, Y., Kwok, S., Masliah, E., Mellors, J., Radhakrishnan, L., Wang, G. und Soontornniyomkij, V.**, 1999; *HIV mediates a productive infection of the brain.* Aids, **13** (15): 2055-9.
232. **Woffendin, C., Ranga, U., Yang, Z., Xu, L. und Nabel, G. J.**, 1996; *Expression of a protective gene-prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients.* Proc Natl Acad Sci U S A, **93** (7): 2889-94.

233. **Wolff, B., Sanglier, J. J. und Wang, Y.**, 1997; *Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo- cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA*. Chem Biol, **4** (2): 139-47.
234. **Woodman, S. E., Benveniste, E. N., Nath, A. und Berman, J. W.**, 1999; *Human immunodeficiency virus type 1 TAT protein induces adhesion molecule expression in astrocytes [In Process Citation]*. J Neurovirol, **5** (6): 678-84.
235. **Yang, L., Morris, G. F., Lockyer, J. M., Lu, M., Wang, Z. und Morris, C. B.**, 1997; *Distinct transcriptional pathways of TAR-dependent and TAR-independent human immunodeficiency virus type-1 transactivation by Tat*. Virology, **235** (1): 48-64.
236. **Yankulov, K. und Bentley, D.**, 1998; *Transcriptional control: Tat cofactors and transcriptional elongation*. Curr Biol, **8** (13): R447-9.
237. **Zapp, M. L., Hope, T. J., Parslow, T. G. und Green, M. R.**, 1991; *Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine- rich binding motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, **88** (17): 7734-8.
238. **Zapp, M. L., Stern, S. und Green, M. R.**, 1993; *Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 Rev protein inhibit Rev function and viral production*. Cell, **74** (6): 969-78.
239. **Zemmel, R. W., Kelley, A. C., Karn, J. und Butler, P. J.**, 1996; *Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element*. J Mol Biol, **258** (5): 763-77.
240. **Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M. B. und Price, D. H.**, 1997; *Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro*. Genes Dev, **11** (20): 2622-32.

### *Veröffentlichung*

Ludwig, E., Ceccherini-Silberstein, F., van Empel, J., Neumann, M., Erfle, V., Brack-Werner, R.: „Diminished Rev-mediated stimulation of HIV-1 protein synthesis is a hallmark of human astrocytes“ (J. Virol., **73**, 10, p. 8279-8289, 1999).

### *Tagungsbeiträge*

Ceccherini-Silberstein, F., van Empel, J., Ludwig, E., Ludvigsen, A., Neumann, M., Erfle, V., Brack-Werner, R.: „Transactivation of late phase HIV-1 m-RNA expression by viral regulator Rev is impaired in human astrocytes: involvement of mandatory RNA binding and putative cellular cofactors“. Molecular Biology of RNA, Giens, France, September 13-18, 1997.

Brack-Werner, R., Ludwig, E., Ceccherini-Silberstein, F., Gerhartz, C., van Empel, J., Neumann, M., Erfle, V.: „Significance of astrocytes as target cells for HIV“. Neuroscience of HIV infection, Chicago, USA, June 3-6, 1998.

Markus Neumann, Francesca Ceccherini-Silberstein, Eva Ludwig, Jutta van Empel, Claudia Gerhartz, Volker Erfle and Ruth Brack-Werner: „Astrocytes: Target cells and reservoirs for HIV-1 in the central nervous system.“ Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen, 9.-12.3.1999.

Jutta van Empel, Eva Ludwig, Markus Neumann, Volker Erfle and Ruth Brack-Werner: „Analysis of RNA binding and oligomerisation activities of the HIV-1 Rev protein in human astrocytes“. Cold Spring Harbor, Retrovirus Meeting, May 25-30, 1999.

Francesca Ceccherini-Silberstein, Markus Neumann, Eva Ludwig, Jutta van Empel, Volker Erfle, and Ruth Brack-Werner: „Restricted HIV-1 expression in astrocytes: Involvement of cellular inhibition of Rev function “. 4<sup>th</sup> international Workshop on HIV, Cells of Macrophage lineage and other Reservoirs, Florence, Italy, December 1-4, 1999.

Markus Neumann, Eva Ludwig, Francesca Ceccherini-Silberstein, Jutta van Empel, Elena Afonina, Volker Erfle, George Pavlakis and Ruth Brack-Werner: „A cytoplasmic function of human astrocytes modulates essentially shuttling properties of Rev from primate lentiviruses impairing productive virus expression“. Cold Spring Harbor, Retrovirus Meeting, May 23-28, 2000.

### *Vorträge*

Jutta van Empel, Francesca Ceccherini-Silberstein, Eva Ludwig : „HIV-1 in the brain: Rev-dependent regulation of HIV-1 expression in astrocytes.“ Vortrag im Rahmen des Diplomanden- und Doktorandenseminars des Instituts für Genetik der LMU München, 26.5.1997.

Van Empel, J., Ludwig, E., Neumann, M., Erfle, V., Brack-Werner, R.: „Functional analysis of HIV-1 regulatory proteins in human astrocytes“. Third European Conference on Experimental AIDS Research, Munich, Germany, February 28 -March 3, 1998.

„Molekulare Mechanismen der eingeschränkten HIV-Produktion in Astrozyten: Untersuchung der Rev-abhängigen Regulation“. Vortrag im Rahmen der Jahrestagung des SFB 464 in Wildbad Kreuth, 20.-21.05.1997.

J. van Empel, E. Ludwig, F. Ceccherini-Silberstein, V. Erfle, M. Neumann, R. Brack-Werner: „Functional studies of HIV-1 Regulation in human astrocytes“. Vortrag im Rahmen des Research Festival 1999 am Klinikum Großhadern vom 14.-16.10.1999 in München.

## *Lebenslauf*

Name: Jutta van Empel  
Anschrift: Schmaedelstraße 24, 81245 München  
Geburtsdatum: 01.08.1968  
Geburtsort: Kleve, Niederrhein  
Familienstand: ledig  
Eltern: Alfred van Empel, Steuerberater (verstorben am 08.07.1991)  
Friedel van Empel, geb. Teurlings, Hausfrau

1974 bis 1978 Mariengrundschule in Kleve – Materborn  
1978 bis 1987 Johanna-Sebus-Gymnasium in Kleve, Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

1987 bis 1988 Einjährige Höhere Handelsschule für Abiturienten an den berufsbildenden Schulen des Kreises Kleve  
1988 bis 1990 Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin an der Rheinischen Akademie e. V. in Köln

WS 1990 bis SS 1992 Studium der Biologie an der Universität zu Köln (Abschluß: Vordiplom)  
WS 1992 bis SS 1995 Weiterführung des Studiums an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München (Diplomprüfung abgelegt im Sommersemester 1995)  
WS 1995 Diplomarbeit bei Frau Prof. Kahmann am genetischen Institut der LMU in München und Erlangung des Diploms am 17.04.1996  
01.08.1996 Anfertigung der Promotion in der Arbeitsgruppe von  
bis 31.12.1999 PD Dr. Ruth Brack-Werner an der GSF, München-Neuherberg)

## *Danksagung*

Frau PD Dr. Ruth Brack-Werner möchte ich für die Stellung des Themas und die Betreuung des Projekts danken. Sie war immer bereit zu Diskussionen, brachte Ideen und Anregungen ein und hatte auch ein offenes Ohr für Probleme.

Herrn Prof. Lutz Gürtler danke ich für die Übernahme des Gutachtens und die freundliche und aufmerksame Verfolgung dieser Arbeit auch weit über die Grenzen von München hinaus.

Herrn Prof. Erfle danke ich für die Möglichkeit der Mitarbeit am Institut für molekulare Virologie der GSF/Neuherberg und die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Allen Mitarbeitern der IMV danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und all die „Tipps und Tricks“. Ganz besonderer Dank gilt dabei der Arbeitsgruppe „HIV-Regulation“ für das gute Laborklima und die zahlreichen Gespräche, nicht zu vergessen Dr. Markus Neumann besonders für seine fachmännische Hilfe in Computerfragen.

Danken möchte ich auch den Damen aus der Spülküche, die nicht nur für die Ausstattung der Labors mit Wasser, Puffern und sauberen Glaswaren verantwortlich sind, sondern auch auf die „kleinen“ Fragen des Laboralltags immer eine Antwort wissen.

Frau Dr. Eva Ludwig gilt mein Dank für die Ausbesserung meiner „Stilblüten“.

Großer Dank gilt meiner Mutter, ohne deren Unterstützung in jeglicher Hinsicht diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre, und meinem Vater, der dies nicht mehr erleben durfte, mein Studium aber erst ermöglichte.

Herrn Dr. Götz Kühne danke ich für die Ideen und Diskussionen und besonders für seine liebevolle Zuwendung und Motivation während der Fertigstellung dieser Arbeit.



