

Funktionelle Analyse der Rev Transaktivierung des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg
Department Chemie

vorgelegt von
Dirk Hoffmann
aus Bergkamen-Rünthe
2010

Heinrich-Pette-Institut
Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie
Abteilung Zellbiologie und Virologie
Leiter: Prof. Dr. Joachim Hauber

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Bredehorst
2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Hauber

Tag der Disputation: 14.01.2011

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	5
2	ABSTRACT	7
3	EINLEITUNG	9
3.1	DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS (HIV)	9
3.2	MORPHOLOGIE VON HIV-1.....	9
3.3	REPLIKATIONSZYKLUS.....	10
3.4	BLOCKADEN BEI DER REPLIKATION IN MURINEN ZELLEN.....	11
3.5	GENOMSTRUKTUR	12
3.6	VIRALE MRNA KLASSEN	13
3.7	NUKLEOZYTOPLASMATISCHER TRANSPORT VON MRNA.....	14
3.8	DAS REGULATORISCHE REV PROTEIN UND SEINE RRE-RNA ZIELSTRUKTUR	15
3.8.1	<i>Rev-RRE Bindung und Multimerisierung</i>	16
3.8.2	<i>Kernimport und -export von Rev</i>	18
3.8.3	<i>Rev Transaktivierung</i>	19
3.8.4	<i>Rev Kofaktoren</i>	21
3.9	THERAPIE	24
3.10	AUFGABENSTELLUNG	24
4	MATERIAL	26
4.1	BAKTERIENSTÄMME	26
4.2	ZELLINIEN.....	26
4.3	PLASMIDE.....	27
4.4	OLIGONUKLEOTIDE.....	29
4.5	ANTIKÖRPER.....	30
4.6	ENZYME.....	31
4.7	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	31
4.8	PUFFER UND LÖSUNGEN	31
4.9	KITS.....	33
4.10	MEDIEN	33
5	METHODEN	34
5.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
5.1.1	<i>PCR</i>	34
5.1.2	<i>Agarose Gelelektrophorese</i>	34
5.1.3	<i>DNA Gelextraktion und Aufreinigung von PCR Produkten</i>	35
5.1.4	<i>Restriktionsverdau</i>	35
5.1.5	<i>Ligation</i>	35
5.1.6	<i>Transformation der Plasmide in E. coli</i>	35
5.1.7	<i>Mini und Maxi Plasmidpräparation</i>	36
5.1.8	<i>Konstruktion der Expressionsplasmide</i>	36
5.1.9	<i>Isolierung von RNA</i>	37
5.1.10	<i>Fraktionierung von nukleärer und zytoplasmatischer RNA</i>	37
5.1.11	<i>Reverse Transkription der mRNA</i>	38
5.1.12	<i>Semiquantitative RT-PCR</i>	38
5.1.13	<i>Quantitative Realtime RT-PCR</i>	38
5.1.14	<i>Slot Blot mit den subzellulären RNA Fraktionen und Hybridisierung mit einer radioaktiven U6-Sonde</i>	39
5.2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	39
5.2.1	<i>Herstellung des Gesamtzellsats</i>	39
5.2.2	<i>SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	40
5.2.3	<i>Western Blot (Semi-dry)</i>	40
5.3	IMMUNO- UND ENZYMASSAYS.....	41
5.3.1	<i>p24 ELISA</i>	41
5.3.2	<i>CAT ELISA</i>	41
5.3.3	<i>SEAP Reporterassay</i>	42
5.3.4	<i>β-GAL Reporterassay</i>	42
5.4	BAKTERIOLOGISCHE METHODEN.....	42

5.4.1	Kultivierung von Bakterien	42
5.5	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	43
5.5.1	Kultivierung von adhärennten Säugerzellen.....	43
5.5.2	Kultivierung von Suspensionszellen.....	43
5.5.3	Transfektion von HeLa Zellen mit TurboFect oder TransIT.....	43
5.5.4	Transfektion von COS-7 Zellen mit DEAE Dextran.....	43
5.5.5	Herstellung von lentiviralen Partikeln.....	44
5.5.6	Transduktion mit lentiviralen Partikeln zur Herstellung stabiler shRNA Zellen.....	45
5.5.7	Infektion mit HIV-1	45
5.5.8	Transfektion mit dem Rev Reporter pDM128/RRE.....	46
5.5.9	Transfektion mit dem GPV-RRE Reporter.....	46
5.5.10	Virus Rescue Assay mit pHXB2ΔBam.....	47
5.5.11	In vivo RRE Bindungsassay mit dem SLIIB/CAT Reporter.....	47
5.5.12	FACS-basierte FRET Analyse.....	48
5.5.13	RNA Stabilitätsstudien	48
5.5.14	Heterokaryonstudien.....	49
5.6	MIKROSKOPISCHE METHODEN	49
5.6.1	Indirekte Immunfluoreszenz für Rev Lokalisationsstudien.....	49
6	ERGEBNISSE	50
6.1	DIE ROLLE DER MULTIMERISIERUNG BEI DER REV TRANSAKTIVIERUNG	50
6.1.1	Rev Mutanten für Multimerisierungsstudien.....	50
6.1.2	Biologische Aktivität der Mutanten im Virus Rescue Assay (HXB2ΔBam).....	51
6.1.3	Darstellung der Rev Komplexbildung mit Hilfe einer FACS-basierten FRET Analyse.....	55
6.1.4	Einfluss der Rev Multimerisierung auf die Stabilität der ungespleißten RNA.....	57
6.1.5	Einfluss der CRM1-Rev Interaktion auf die ZipRevSLT40 Transaktivierung.....	59
6.1.6	Einfluss der Rev Multimerisierung auf Rev Shuttling und CRM1 Interaktion	60
6.1.7	Rekonstitution der biologischen Rev Aktivität durch chemisch-induzierte Homodimerisierung.....	62
6.1.8	Charakterisierung von Rev Heterodimerisierungsmutanten.....	63
6.1.9	Einfluss der RevSLT40M10 Doppelmутante auf die RNA Bindung	63
6.1.10	Biologische Aktivität der chemisch-induzierbaren Rev Heterodimere	64
6.2	DIE ROLLE VON ZELLULÄREN KOFAKTOREN BEI DER REV TRANSAKTIVIERUNG.....	66
6.2.1	Identifizierung von zellulären humanen Faktoren im murinen System.....	66
6.2.2	Spezies-spezifischer Einfluss von Sam68 auf die Prozessierung und Assemblierung Rev-abhängiger Transkripte	68
6.2.3	Effekt von Sam68 auf die Expression von Rev-abhängiger mRNA	69
6.2.4	Effekt von Sam68 auf die Funktion des MPMV CTE	70
6.2.5	Funktionelle Charakterisierung von Sam68 auf die HIV-1 Replikation im permissiven humanen HLCD4-CAT System.....	72
6.2.6	Hemmung der Sam68 Expression durch ein lentivirales shRNA System	72
6.2.7	Effekt von Sam68 auf die HIV-1 Replikation in HLCD4 Zellen.....	73
6.2.8	Einfluss von Sam68 auf die Replikation in HIV-1 Infektionsexperimenten.....	74
6.2.9	Sam68 Silencing in ACH-2 Zellen und HIV Replikation.....	75
6.2.10	Expression von SLM1 und SLM2 in HLCD4 Zellen	76
6.2.11	Reduzierung der SLM2 Expression durch ein lentivirales shRNA System.....	77
6.2.12	Einfluss von SLM2 auf die transiente Expression von HXB2ΔBam.....	78
6.2.13	Funktion von SLM2 auf die nukleozytoplasmatische Verteilung der HIV-1 mRNA und das Spleißen der viralen Transkripte	79
6.2.14	Reduktion der Sam68 und SLM2 Expression in HLCD4 Zellen	80
6.2.15	Einfluss der Reduktion von Sam68 und SLM2 auf die HIV-1 Replikation im transienten Reportersystem und im Infektionsexperiment	81
7	DISKUSSION	83
7.1	CHARAKTERISIERUNG DER REV MULTIMERISIERUNG.....	84
7.2	CHARAKTERISIERUNG DER FUNKTION VON SAM68 UND SLM2 BEI DER HIV REPLIKATION	88
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
9	LITERATURVERZEICHNIS	97
10	R + S SÄTZE FÜR GEFAHRENSTOFFE	108

1 Zusammenfassung

Das HIV-1 Transaktivatorprotein Rev ist ein essentieller Regulator der Virusreplikation. Rev vermittelt den Kernexport, die Stabilität und die Translation der viralen ungespleißten und einfach-gespleißten mRNAs, welche für die viralen Strukturproteine und Enzyme (Gag, Pol, Env) kodieren. Rev interagiert mit diesen viralen Transkripten über die direkte Bindung an ein hochstrukturiertes RNA Motiv innerhalb der *env*-Region, dem RRE (*Rev Response Element*). Die Bindung eines Rev Monomers führt zur Bildung von homomultimeren Rev Komplexen entlang der RRE-RNA. Danach interagiert Rev über sein Kernexportsignal (NES), welches sich in der carboxyterminalen Aktivierungsdomäne von Rev befindet, mit dem zellulären Kernexportrezeptor CRM1. Dieser transportiert die Rev-enthaltenden RNP Komplexe durch die Kernporenkomplexe (NPC) vom Zellkern in das Zytoplasma der Wirtszelle. Neben CRM1 wurden bisher noch mehrere weitere Wirtszellfaktoren beschrieben, die an diesem Prozess direkt oder indirekt beteiligt sind.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Rolle der Multimerisierung bei der Rev Transaktivierung im Detail zu untersuchen und putative Rev Kofaktoren funktionell zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Studie konnte anhand einer multimerisierungsdefizienten Rev Mutante gezeigt werden, dass die Multimerisierung von Rev für den nukleozytoplasmatischen Transport von *gag* und *env* mRNA notwendig ist. Für die Interaktion von Rev mit CRM1 und sein Pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma (*Shuttling*), in Abwesenheit von RRE-RNA, muss das virale Protein jedoch keine homomultimeren Komplexe bilden. Rev trägt unabhängig von seinem multimeren Status zur Stabilisierung der viralen ungespleißten mRNA bei. Die Bildung von Rev Dimeren über heterologe Dimerisierungsmotive ist ausreichend, um die Rev Transaktivierung einer biologisch inaktiven multimerisierungsdefizienten Rev Mutante zu einem großen Teil wiederherzustellen. Es wurde zudem gezeigt, dass in einem funktionellen RNP Komplex zwei Rev Aktivierungsdomänen benötigt werden. Vermutlich vermittelt hierbei eine zweite Rev Aktivierungsdomäne entweder die Interaktion mit einem weiteren CRM1 Molekül oder die Rekrutierung zusätzlicher, bisher noch nicht identifizierter Wirtszellfaktoren.

Im Rahmen der Rev Transaktivierung wurden die beiden zellulären Proteine der *Signal Transduction and Activation of RNA* (STAR) Familie Sam68 und SLM2 genauer charakterisiert. Hierbei stellte sich heraus, dass Sam68 signifikant die Expression von Gag Strukturproteinen erhöht, wodurch in murinen Zellen die bekannte natürliche Blockade bei der HIV-1 Assemblierung umgangen werden kann. Sam68 stellt jedoch keinen Spezies-spezifischen Restriktionsfaktor in Mauszellen dar, da die Sam68 Funktion einen allgemeinen

Effekt auf virale ungespleißte mRNA ausübt, unbeeinflusst von der Tatsache, ob die viralen Transkripte Rev-abhängig oder Rev-unabhängig ins Zytoplasma transportiert wurden.

In permissiven humanen Epithelzellen und Lymphozyten beeinträchtigte die Hemmung von Sam68 durch RNA Interferenz (RNAi) nicht die HIV-1 Replikation. Die Funktion von Sam68 wird in diesen Zellen vermutlich durch SLM2 ersetzt. Hierbei zeigte sich SLM2 in RNAi Studien als notwendiger Faktor für die virale Replikation. Die Hemmung von SLM2 verhinderte sowohl einen effizienten Kernexport von ungespleißter mRNA, als auch deren Spleißen im Zellkern. Dies deutet auf eine frühe Funktion von SLM2 bei der HIV-1 Genexpression hin, die möglicherweise zur 3'-End Prozessierung der viralen mRNA beiträgt. Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die beiden Proteine Sam68 und SLM2 eine distinkte Rolle im Replikationszyklus von HIV-1 spielen, hierbei aber nicht direkt die Rev Transaktivierung beeinflussen. Die einzelnen STAR Proteine bilden aller Voraussicht nach einen variablen heteromultimeren Komplex, in dem Sam68 und SLM2 redundante Funktionen bei der HIV-1 Genexpression ausüben.

Die gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen ein verbessertes Verständnis der Funktion von Rev und den zellulären Faktoren Sam68 und SLM2 im Zuge der HI-Virusreplikation. Dies trägt zur weiteren Aufklärung des genauen Mechanismus der Rev Transaktivierung bei.

2 Abstract

The HIV-1 *trans*-activator protein Rev is an essential regulator of viral replication. Rev promotes the nuclear export, stability and translation of unspliced and partially spliced HIV-1 mRNA encoding the viral structural proteins and enzymes (Gag, Pol, Env). Rev interacts with these viral mRNAs by directly binding to the RRE (Rev Response Element), a highly structured RNA stem loop region within the *env* sequence. After binding as a monomer Rev forms a homomultimeric complex on the RRE-RNA structure. Subsequently, Rev interacts with the nuclear export receptor CRM1 via its nuclear export signal (NES), which is part of the carboxy-terminal activation domain of the protein. Thereupon, CRM1 mediates the nucleocytoplasmic transport of Rev-containing RNP complexes through nuclear pore complexes (NPC) of the host cell. Besides CRM1, various additional cellular factors have been described, which may directly or indirectly participate in Rev *trans*-activation.

The purpose of these studies was to analyze the role of Rev's multimerization for Rev-mediated *trans*-activation in detail and, furthermore, to functionally characterize selected putative Rev cofactors.

These studies revealed that the formation of a Rev homomultimer is essential for the nucleocytoplasmic transport of viral *gag* and *env* mRNA. However, multimerization is not required for the interaction of Rev with CRM1 and therefore for Rev shuttling in the absence of the RRE-RNA binding. Rev promotes the stability of viral *gag* mRNA independent of its multimeric status. Formation of a Rev dimer via heterologous dimerization motifs is apparently sufficient to significantly reconstitute Rev *trans*-activation in an otherwise biological inactive multimerization-deficient Rev mutant. Furthermore, it was demonstrated that at least two Rev activation domains are required to form a functional (i.e. nuclear export-competent) RNP complex. The presence of a second Rev activation domain therefore mediates either the interaction with an additional CRM1 molecule or the recruitment of one or more additional, so far unknown, cellular cofactors.

Two members of the signal transduction and activation of RNA (STAR) protein family Sam68 and SLM2 were further characterized with respect to their function in Rev *trans*-activation. Sam68 significantly enhanced Gag expression and was able to bypass the established HIV-1 assembly block in murine cells. However, Sam68 did not constitute a species-specific restriction factor in murine cells, since Sam68 enhanced expression of unspliced viral mRNA in general, irrespective of the fact whether or not these transcripts were subject to Rev-regulation.

Interestingly, the silencing of Sam68 by RNA interference (RNAi) does not inhibit HIV-1 replication in human permissive epithelial or lymphoid blood cells. In these cells Sam68 activity was apparently compensated by increased SLM2 expression. Moreover, it was shown by RNAi studies that SLM2 constitutes a crucial factor for HIV-1 replication. The RNA silencing of SLM2 inhibited both, efficient nuclear export of viral unspliced RNA and their splicing. Therefore, SLM2 seems to play a role in an early step of HIV-1 gene expression, conceivably by promoting 3'-end processing of viral transcripts. In sum, both proteins Sam68 and SLM2 play a distinct role in the replication cycle of HIV-1, but do not directly contribute to Rev *trans*-activation. These STAR proteins presumably form a variable heteromultimeric complex, in which Sam68 and SLM2 play a redundant role during viral gene expression.

These studies improved the understanding of the mechanisms involved in Rev-mediated *trans*-activation and further elucidated the role of the cellular factors Sam68 and SLM2 in HIV-1 replication.

3 Einleitung

3.1 Das humane Immundefizienzvirus (HIV)

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) gehört zur Gattung der Lentiviren und zur Familie der *Retroviridae*. In der Natur treten zwei Typen des Immunschwächevirus auf, HIV-1 (Barresinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984) und HIV-2 (Clavel *et al.*, 1986). Das Retrovirus ist der Auslöser der Immunschwächekrankheit AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), wobei hauptsächlich HIV-1 für die globale AIDS Epidemie verantwortlich ist. Durch mehr als 25 Jahre intensive Forschungsarbeit sind heute viele Einzelheiten zur Pathogenese und Biologie von Retroviren bekannt. Dennoch sind wichtige Details im komplexen Replikationszyklus des Virus und zum Krankheitsverlauf bisher ungeklärt.

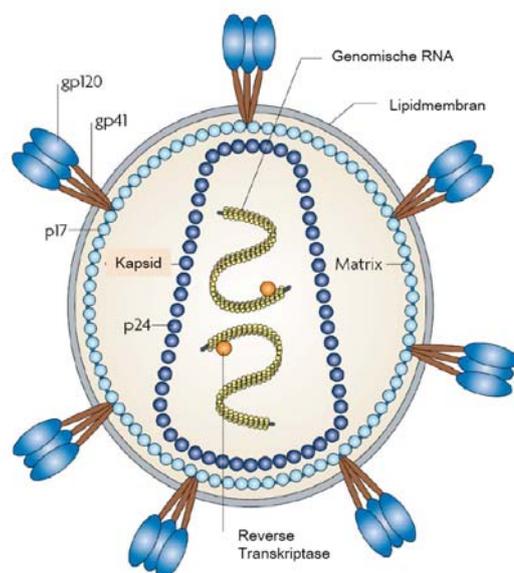


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von HIV-1. Dargestellt ist das Virion bestehend aus der Lipidmembran, die von der Wirtszelle stammt. In der Membran verankert sind die Glykoproteine gp41 und gp120. Das Matrixprotein p17 ist mit der Membran assoziiert. Innerhalb des Virions befindet sich das konische Kapsid, welches die beiden Kopien der genomischen RNA beinhaltet. Modifiziert aus Haedestam *et al.*, 2008.

3.2 Morphologie von HIV-1

Der infektiöse Viruspartikel ist in Abbildung 1 gezeigt und hat einen Durchmesser von etwa 100 nm (Ohagen *et al.*, 1997). Das Virus ist von einer Hüllmembran umgeben, die von der Plasmamembran der Wirtszelle stammt. Mit der Membran sind die viralen Glykoproteine gp41 und gp120 assoziiert. Das Transmembranprotein (TM) gp41 ist direkt in der

Hüllmembran über einen hydrophoben Teil verankert. Das Oberflächenprotein gp120 (SU) bindet über nichtkovalente Wechselwirkungen an den externen Teil von gp41. Die Innenseite der Membran wird vom p17 Matrixprotein (MA) ausgekleidet. Hierbei ist das Matrixprotein über einen Myristinsäurerest direkt in der Membran verankert, was dem Viruspartikel seine isometrische Struktur verleiht. Im Virusinneren befindet sich die konische Kapsidstruktur, die sich aus dem hydrophoben p24 Kapsidprotein (CA) zusammensetzt. Das Kapsid beinhaltet das Genom des Retrovirus, welches aus zwei in Plus Strang orientierte RNA Kopien besteht. Die genomischen RNA Kopien sind mit dem basischen p7 Nukleokapsidprotein (NC) komplexiert. Zusätzlich sind die retrovirale Protease (PR), Integrase (IN) und Reverse Transkriptase (RT) sowie regulatorische virale Proteine im Kapsid verpackt (zusammengefasst in Gelderblom, 1991).

3.3 Replikationszyklus

Die Infektion erfolgt über die spezifische Bindung des viralen gp120 Glykoproteins an den CD4 Rezeptor der Zielzelloberfläche. Hierbei kommt es zur Konformationsänderung des Glykoproteins. CD4 exprimierende Zellen sind vor allem T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen des Immunsystems, sowie Mikrogliazellen des Gehirns. Zusätzlich benötigt das Virus für die Infektion von Zellen die Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5 als Korezeptoren (Littman, 1998). Hierbei kommt es bei sogenannten T-tropen Viren zur Wechselwirkung mit CXCR4 auf T-Zellen, wobei M-trope Viren mit dem CCR5-Molekül von Makrophagen interagieren. Über das Glykoprotein gp41 findet die Fusion mit der Zellmembran statt und das Kapsid wird in das Zytoplasma freigesetzt (Chan and Kim, 1998).

In einem Prozess der als *Uncoating* bezeichnet wird, kommt es zur Freisetzung der genomischen RNA und der viralen Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (I). Die genomische RNA wird mittels der Reversen Transkriptase und ihrer RNaseH Aktivität in doppelsträngige DNA, dem Provirus, umgeschrieben. Das Provirus bildet mit dem viralen regulatorischen Protein Vpr und Matrixproteinen den Präintegrationskomplex, der in den Zellkern transportiert wird. Dort findet durch die Aktivität der Integrase die Integration der proviralen DNA in die chromosomale DNA der Wirtszelle statt.

Zur Synthese neuer Virionen bedient sich das Virus vieler Komponenten der zellulären Transkriptions-, RNA-Prozessierungs- und Translationsmaschinerie. Die Initiation der Transkription findet durch die Bindung mehrerer zellulärer Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B statt (Jones and Peterlin, 1994). Zuerst werden die frühen regulatorischen und akzessorischen Proteine Rev, Tat und Nef exprimiert. Danach kommt es zur Expression der

viralen Gag Strukturproteine und Pol Enzyme, der Oberflächenproteine Env und weiterer akzessorischer Proteine.

Die Virionen werden an der Plasmamembran assembliert. Es entsteht ein Nukleoproteinkomplex aus Gag Polyproteinen und der viralen genomischen RNA. Hierbei bindet das Nukleokapsidprotein an die Erkennungssequenz der genomischen RNA. Das Matrixprotein interagiert mit gp41 und assoziiert über Myristinsäurereste direkt mit der Plasmamembran. Die Prozessierung der Polyproteine, die Virusreifung, findet erst während der exozytotischen Virusknospung (*Budding*) statt (zusammengefasst in Turner and Summers, 1999; Freed, 2001).

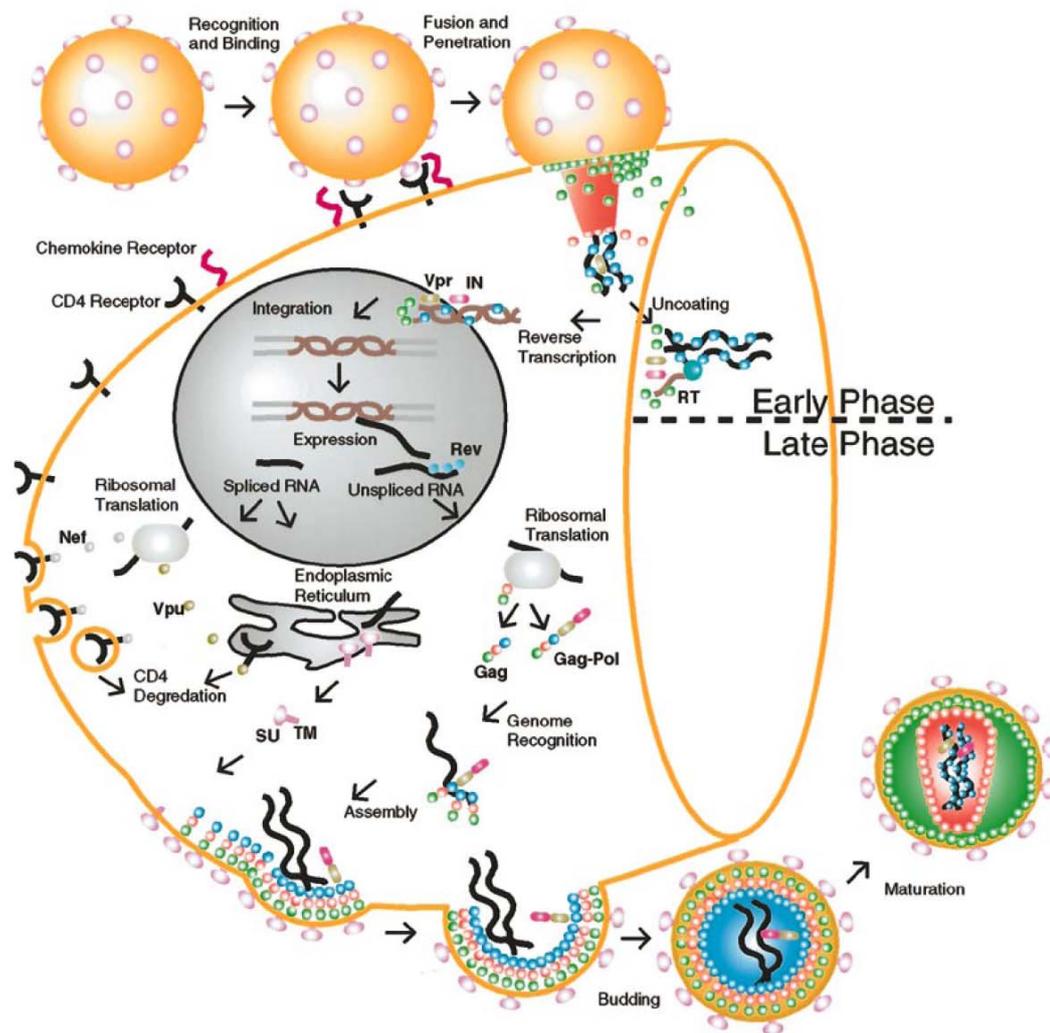


Abbildung 2: Replikationszyklus von HIV-1. Detaillierte Erläuterung im Text (Turner *et al.*, 1999).

3.4 Blockaden bei der Replikation in murinen Zellen

Das HI-Virus kann in Mauszellen nicht replizieren. Durch die Untersuchung der natürlichen Schranken im Lebenszyklus von HIV im murinen System konnten verschiedene menschliche

Gene identifiziert werden, die für die virale Replikation notwendig sind. So konnte durch die Rekonstitution des Viruseintritts die Rolle des CD4 Rezeptors und der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 bei der Infektion aufgeklärt werden (Maddon *et al.*, 1986; Feng *et al.*, 1996). Ebenso wurde die Funktion von CyclinT1 bei der viralen Transkription charakterisiert (Garber *et al.*, 1998). Dennoch ist die HIV Replikationsfähigkeit in transgenen Mauszellen, die humanes CD4, CXCR4 und CCR5 auf der Oberfläche, sowie das CyclinT1 exprimieren, deutlich eingeschränkt. (Mariani *et al.*, 2000; Bieniasz and Cullen, 2000). Eine weitere Restriktion findet auf der Ebene der Prozessierung der Strukturproteine und des Zusammenbaus der Partikel statt. Dies ist auf eine ineffiziente Assoziation des Gag Polyproteins mit der Plasmamembran zurückzuführen (Mariani *et al.*, 2000). In murin-humanen Heterokaryon- und Hybridzellen wird diese Fehlfunktion wiederhergestellt. Dies lässt auf fehlende zelluläre Transaktivatoren für die Partikelproduktion in Mauszellen schließen (Coskun *et al.*, 2007).

3.5 Genomstruktur

HIV ist ein sogenanntes komplexes Retrovirus, das auf seiner genomischen RNA neben den drei Genen *gag* (*group specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*) weitere Gene für die regulatorischen Proteine Tat und Rev, sowie für die akzessorischen Proteine Vpr, Vpu, Vif und Nef trägt. Das RNA Genom hat eine Größe von etwa 9,5 kb (Frankel and Young, 1998). Im integrierten Provirus werden die viralen Gene von *Long Terminal Repeat* (LTR)-Regionen flankiert, bei denen es sich um identische Sequenzen von etwa 600 Basen handelt. Innerhalb dieser Sequenzen befinden sich charakteristische Promotor und Enhancer Regionen, die für die Transkription eine entscheidende Rolle spielen (Rosen *et al.*, 1985). Für die effiziente Elongation der viralen Transkripte durch die zelluläre Polymerase II muss das frühe regulatorische Protein Tat (*Transactivator of Transcription*) an die TAR (*Transactivating Response Element*) RNA Sequenz in der neu entstehenden RNA binden. Durch die spezifische Bindung an diese Haarnadel Struktur werden zelluläre Faktoren rekrutiert und die Prozessivität der Polymerase gesteigert (Yankulov and Bentley, 1998). Die virale mRNA wird analog zur eukaryotischen mRNA posttranskriptional modifiziert und trägt eine 5'-Cap Struktur und ist am 3' Ende polyadenyliert.

Gag (p55) und Gag-Pol werden als Polyproteine translatiert und während der Virusreifung durch die virale Protease prozessiert. So ergeben sich aus dem Gag Polyprotein die vier Strukturproteine Matrix (p17), Kapsid (p24), Nukleokapsid (p7) und p6, sowie die sogenannten *Spacer* Peptide p1 und p2. Das *pol*-Gen kodiert für die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Es besitzt keinen eigenen Translationsstart und wird, wie zuvor erwähnt, als Gag-Pol Polyprotein exprimiert. Dies

geschieht durch eine gelegentliche Verschiebung des Leserahmens. Die Membranproteine gp41 und gp120 werden als Vorläuferprotein gp160 translatiert, im Golgi Apparat glykosyliert und von der zellulären Furin Protease prozessiert (Turner *et al.*, 1999; Freed, 2001).

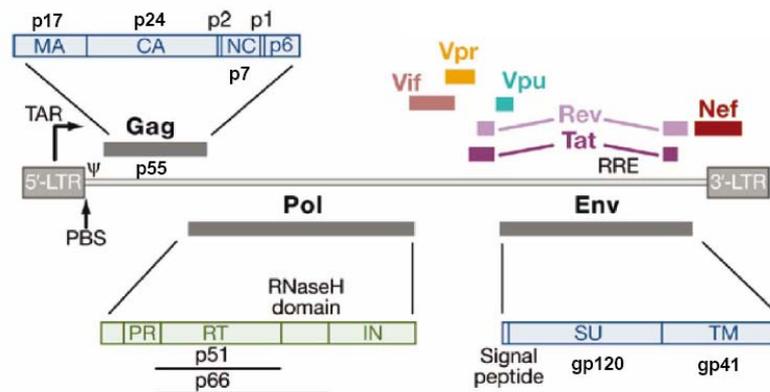


Abbildung 3: Genomische Organisation von HIV-1. Die Abbildung illustriert die komplexe Organisation der HIV-1 Gene und die kodierten Proteine. Die Strukturproteine Gag und Env und die Pol Enzyme (Reverse Transkriptase mit RNaseH Domäne, Protease und Intergrase) werden in Form eines Polyproteins exprimiert. Zusätzlich kodiert HIV-1 für die beiden regulatorischen Proteine Tat und Rev, sowie für die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef (modifiziert aus Swanson and Malim, 2008).

3.6 Virale mRNA Klassen

HIV kodiert für eine Vielzahl von Genen auf nur einer Transkriptionseinheit. Die verschiedenen Genprodukte entstehen durch alternatives Spleißen der 9,5 kb mRNA (Feinberg *et al.*, 1986; Purcell and Martin, 1993). Dabei treten während des Replikationszyklus in einer zeitlichen Verteilung drei unterschiedliche Klassen von viralen mRNAs auf (Kim *et al.*, 1989).

Die erste Klasse umfasst die frühen ~ 2kb mehrfach (komplett) gespleißten mRNAs, bei denen die Sequenzen für *gag-pol* und *env* entfernt wurden. Sie kodieren in der frühen Phase der Replikation für die Proteine Tat, Rev und Nef. Diese RNAs werden über den allgemeinen zellulären RNA Exportweg ins Zytoplasma transportiert. Der zweiten Klasse, den einfachgespleißten ~ 4kb Transkripten, fehlt die *gag-pol* Region und sie kodieren für Env, Vpr, Vpu und Vif. Die ungespleißten ~ 9kb Transkripte kodieren für Gag und Gag-Pol und stellen auch die genomische RNA dar. In infizierten Zellen können mehr als 30 verschiedene mRNA Spezies nachgewiesen werden, die durch die Erkennung von 4 verschiedenen 5'-Spleißstellen und acht verschiedenen 3'-Spleißstellen entstehen (Schwartz *et al.*, 1990; Guatelli *et al.*, 1990; Purcell *et al.*, 1993). Die ungespleißten viralen mRNA Transkripte werden vergleichsweise ineffektiv von der zellulären Spleißmaschinerie prozessiert.

Hierdurch entstehen große Mengen intronhaltiger viraler mRNA im Zellkern (Chang and Sharp, 1989b; Malim and Cullen, 1993). Diese enthalten sogenannte *cis*-Repressor Sequenzen (CRS) bzw. inhibierende Sequenzen (INS), die sich innerhalb der Intronregionen dieser viralen RNAs befinden. Dadurch wird die Genexpression dieser Transkripte verhindert (Cochrane *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1992). Die intronhaltigen Spezies würden unter normalen Umständen im Kern zurückgehalten, bis sie entweder vollständig gespleißt oder abgebaut sind (Nakielny *et al.*, 1997). Die Expression ihrer Gene wird erst durch das virale Rev Protein ermöglicht (Terwilliger *et al.*, 1988; Malim *et al.*, 1988). Dieses bindet direkt an die besagten RNAs über eine *cis*-aktive Region innerhalb des *env* Introns, dem *Rev Response Element* (RRE) (Rosen *et al.*, 1988; Hadzopouloucladaras *et al.*, 1989) und es kommt zur Rev-vermittelten Transaktivierung. Diese vermittelt den nukleozytoplasmatischen Transport der unvollständig gespleißten Transkripte (Felber *et al.*, 1989; Malim *et al.*, 1989b).

3.7 Nukleozytoplasmatischer Transport von mRNA

Beim nukleozytoplasmatischen Transport von mRNA assoziiert diese mit vielfältigen Komponenten der Wirtszelle zu einem komplexen Ribonukleoproteinkomplex (RNP Komplex). Dieser RNP Komplex enthält spezifische Rezeptoren, die den mRNA Export über den Kernporenkomplex (NPC – *Nuclear Pore Complex*) einleiten. Der NPC setzt sich aus ungefähr 50 verschiedenen Komponenten, den sogenannten Nukleoporinen zusammen (Ohno *et al.*, 1998). Die am besten charakterisierten Faktoren für den Export von mRNA sind TAP (NXF1) und CRM1 (Exportin 1) (Cullen, 2003).

Die meisten zellulären mRNAs werden über den heterodimeren Komplex aus TAP und p15, den sogenannten TAP Exportweg, aus dem Kern transportiert. Das TAP/ p15 Dimer wird von der gespleißten RNA über zelluläre Faktoren wie dem EJC (*exon junction complex*) oder SR Proteine (Serin/Arginin-reiche Proteine) rekrutiert. Danach wird die mRNA über die Interaktion mit Nukleoporinen aus dem Kern transportiert (Stutz and Izaurralde, 2003). TAP vermittelt auch den Export von viraler ungespleißter RNA, z.B. des MPMV (*Mason Pfizer Monkey Virus*). Hierbei interagiert TAP über einer spezielle *cis*-aktive Sequenz, dem CTE (*Constitutive Transport Element*), direkt mit der retroviralen RNA und es kommt zum Export der intronhaltigen MPMV Transkripte (Bray *et al.*, 1994; Gruter *et al.*, 1998).

CRM1 ist ein Mitglied der Kernexportrezeptorfamilie der Karyopherine und nicht verwandt mit TAP und p15. Das Karyopherin vermittelt hauptsächlich den nukleozytoplasmatischen Transport von Proteinen, welche ein Leuzin-reiches NES (*Nuclear Export Signal*) besitzen. CRM1 bindet direkt über das NES an die Frachtproteine, interagiert mit Nukleoporinen des

NPCs und transportiert die Proteine energieabhängig über die Hydrolyse von RanGTP ins Zytoplasma. CRM1 vermittelt zudem den Export einzelner zellulärer mRNAs, sowie 5S ribosomale RNAs und U snRNAs (Cullen, 2003; Schutz *et al.*, 2006). Eine entscheidende Rolle spielt CRM1 beim Kernexport der ungespleißten und einfach-gespleißten HIV-1 mRNAs, wobei die Interaktion nicht direkt, sondern über das virale RNA-bindende Protein Rev stattfindet (Pollard and Malim, 1998).

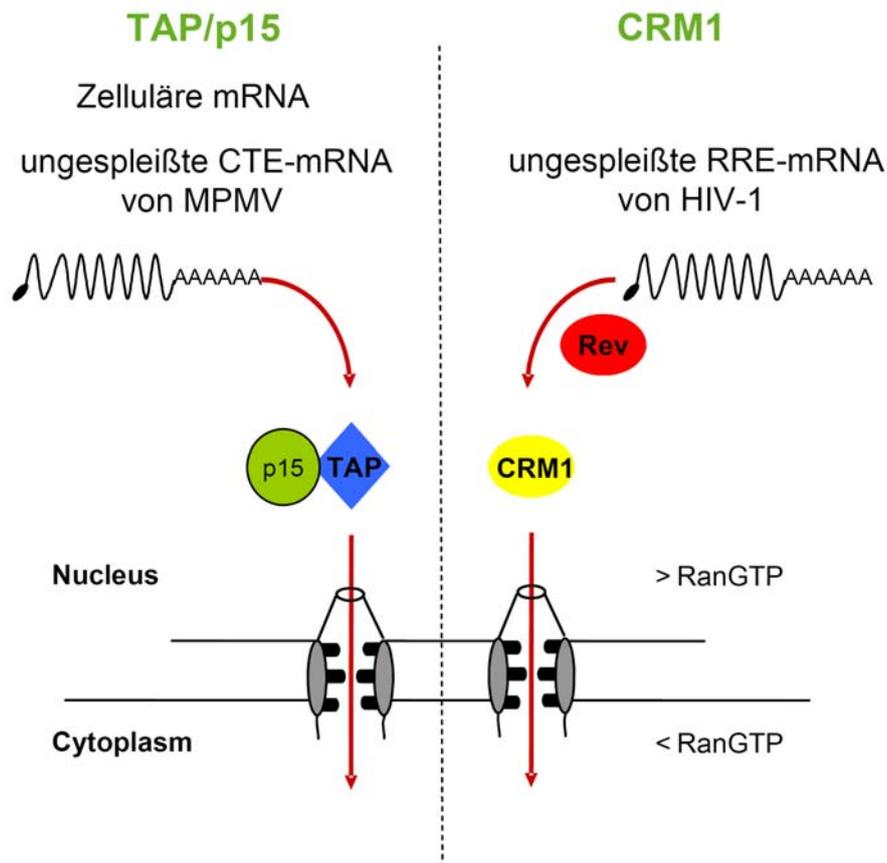


Abbildung 4: Nukleozytoplasmatischer Export von RNA. Dargestellt sind die beiden voneinander unabhängigen RNA Kernexportwege. Der Export der meisten zellulären mRNAs und der ungespleißten mRNA des *Mason Pfizer Monkey Virus* erfolgt über TAP/p15. Ungespleißte mRNA von HIV-1 wird Rev/RRE-abhängig über den CRM1 Exportweg transportiert.

3.8 Das regulatorische Rev Protein und seine RRE-RNA Zielstruktur

Rev (*Regulator of Expression of Virion*) ist ein RNA-bindendes Phosphoprotein von 116 Aminosäuren. Detaillierte Mutationsanalysen haben verschiedene funktionelle Domänen innerhalb des Rev Proteins identifiziert (s. Abbildung 7 A). Eine aminoterminal Arginin-

reiche Domäne beinhaltet das Kernlokalisierungssignal (NLS) (Kubota *et al.*, 1989; Perkins *et al.*, 1989) sowie die RNA Bindedomäne (RBD) (Zapp *et al.*, 1991). Diese Domäne wird auf beiden Seiten von Sequenzen (MI und MII) flankiert, welche für die Multimerisierung des Proteins verantwortlich sind (Madore *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1997). Eine Leuzin-reiche carboxyterminale Domäne, die sogenannte Transaktivierungsdomäne, interagiert mit zellulären Faktoren und beinhaltet das Kernexportsignal (NES; NH₂-LPPLERLTL-COOH) (Fischer *et al.*, 1995).

Die beschriebene Phosphorylierung an den Serinen 54 und 56 ist für die biologische Funktion nicht notwendig (Hauber *et al.*, 1988; Cochrane *et al.*, 1989). Allerdings deuten *in vitro* Studien darauf hin, dass die Phosphorylierung die Bindung an das RRE verstärkt (Fouts *et al.*, 1997).

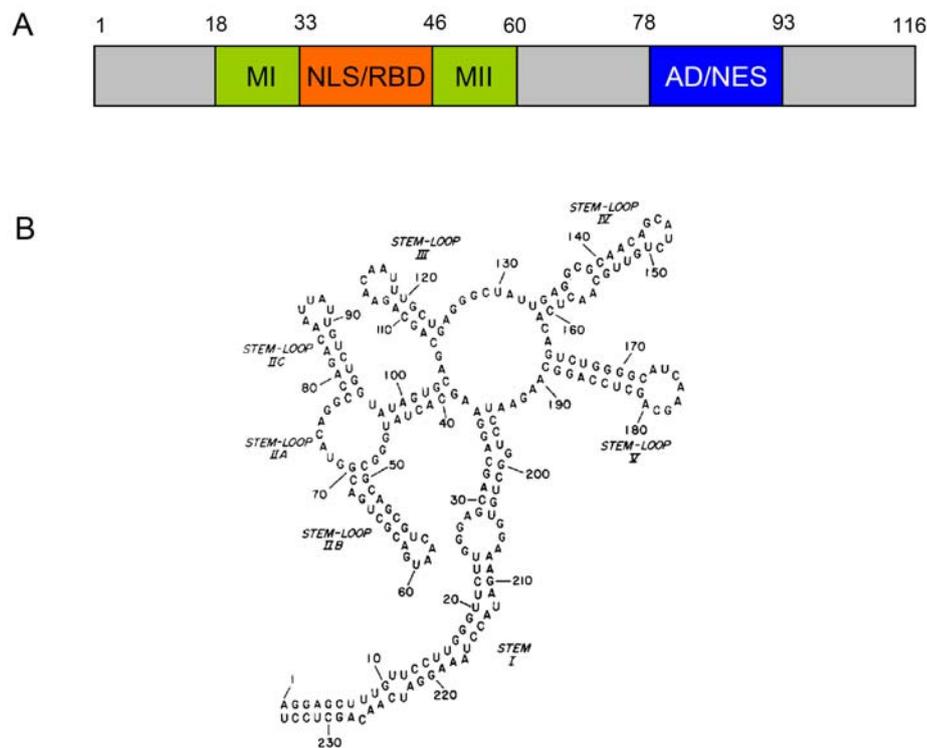


Abbildung 5: (A) Domänenstruktur von Rev. Hervorgehoben sind die RNA Bindungsdomäne (RBD) mit NLS (orange), die beiden Multimerisierungsdomänen MI und MII (grün) und die carboxyterminale Aktivierungsdomäne mit Kernexportsignal (NES) (blau). Zahlen repräsentieren die Aminosäureposition (B) Sequenz und vermutliche Sekundärstruktur des 234 nt RRE. Angegeben ist die nt-Position innerhalb der RRE Sequenz (Malim *et al.*, 1990).

3.8.1 Rev-RRE Bindung und Multimerisierung

Rev bindet über das Arginin-reiche Motiv spezifisch an Sequenzen der komplexen Haarnadelstruktur des RRE (Daly *et al.*, 1989; Zapp and Green, 1989). Das minimale RRE besteht aus 234 Nukleotiden und setzt sich aus fünf *Stem-Loop* Subdomänen (SLI-SLV)

zusammen (Malim *et al.*, 1990) wie in Abbildung 5 B dargestellt. Der SLIIB (*Stem-Loop II B*) stellt die primäre, hoch affine Bindungsstelle für Rev dar (Cook *et al.*, 1991; Tiley *et al.*, 1992). Die SLIIB Sequenz ist somit essentiell für die biologische Aktivität von Rev, sie ist allerdings nicht ausreichend für die Rev Transaktivierung (Huang *et al.*, 1991; Cook *et al.*, 1991). Es wurde gezeigt, dass auch Mutationen in anderen Bereichen von SLII und in SLI die Rev Funktion verhindern (Dayton *et al.*, 1992). Somit scheint das RRE weitere weniger affine RNA Bindungsstellen neben dem SLIIB für Rev zu besitzen (Pollard *et al.*, 1998).

Die N-terminale Domäne von Rev bildet dabei ein *Helix-Loop-Helix* Motiv, wobei durch hydrophobe Wechselwirkung mit anderen Rev Monomeren Homomultimeren gebildet werden (Auer *et al.*, 1994). Ursprünglich wurde ein Modell beschrieben, welches eine einzige einheitliche hydrophobe Interaktionsfläche in der Sekundärstruktur postuliert (Thomas *et al.*, 1997). Aktuelle biochemische Studien und Kristallstrukturdaten (Abbildung 6) gehen von zwei getrennten Interaktionsbereichen aus (Jain and Belasco, 2001; DiMattia *et al.*, 2010; Daugherty *et al.*, 2010). Mehrere Studien belegen, dass Rev als Monomer an den SLIIB bindet und unter Ausnutzung sekundärer Bindungsstellen, wahrscheinlich im SLI, multimeren Rev Komplexe bildet (Mann *et al.*, 1994). Hierbei rekrutiert das primär gebundene Rev Monomer sukzessiv weitere Rev Moleküle, die entlang des RRE spezifisch multimerisieren (Malim and Cullen, 1991; Zimmel *et al.*, 1996; Pond *et al.*, 2009).

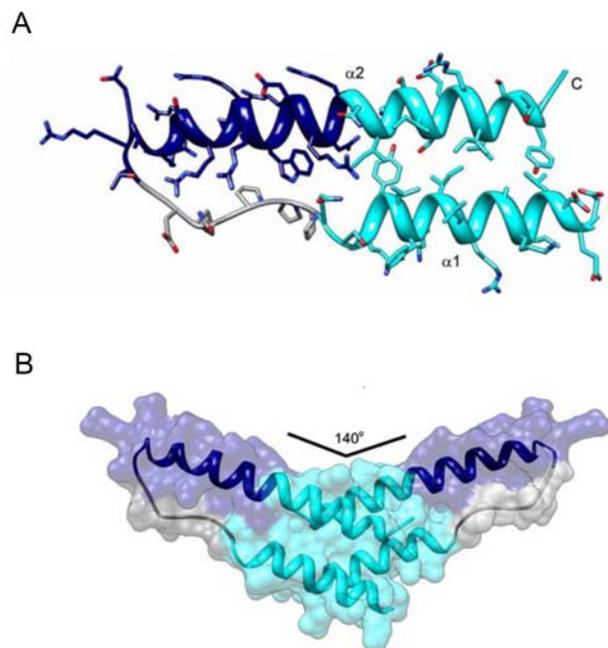


Abbildung 6: Sekundärstruktur eines Rev Monomers (A) und Dimers (B). *Helix-Loop-Helix* Struktur. Gezeigt sind die Multimerisierungsdomänen (Cyan) und die Arginin-reiche RNA Bindedomäne (RDP) mit dem Kernlokalisierungssignal (NLS). Die N-terminale Aktivierungsdomäne ist nicht dargestellt (DiMattia *et al.*, 2010).

Durch funktionelle Analysen von verschiedenen Multimerisierungs-defizienten Mutanten wurde gezeigt, dass die Fähigkeit zur Multimerisierung essentiell für die biologische Aktivität

ist (Malim *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1998). *In vitro* Studien erwiesen, dass bis zu acht Rev Moleküle an das RRE binden (Daly *et al.*, 1993a). Die exakte Anzahl von Rev Molekülen, die für die Transaktivierung nötig sind, ist jedoch bisher nicht eindeutig definiert.

3.8.2 Kernimport und -export von Rev

Im Gleichgewichtszustand lokalisiert Rev vorzugsweise in den Nukleoli (Cochrane *et al.*, 1990). Durch das Kernimportsignal (NLS) und Kernexportsignal (NES) kommt es zum *Shuttling* des Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma (Kalland *et al.*, 1994; Meyer and Malim, 1994). Hierbei findet der aktive Transport von Rev über die zellulären Karyopherine Importin- β und CRM1 statt (Neville *et al.*, 1997; Henderson and Percipalle, 1997). Die Voraussetzung für den Transport bildet der Gradient von GDP und GTP zwischen Zytoplasma und Kern (Gorlich and Mattaj, 1996).

Der klassische Kernimport von Proteinen geschieht über den heterodimeren Komplex aus Importin- α und Importin- β , wobei Importin- α an das NLS des Zielproteins bindet und Importin- β die Interaktion mit den Nukleoporinen des Kernporenkomplexes vermittelt. Im Gegensatz dazu bindet das Rev-NLS direkt an Importin- β . Es bildet sich ein Komplex aus Rev, Importin- β und RanGDP, der in das Kerninnere befördert wird. Dort kommt es zur Dissoziation des Komplexes durch die Bindung von RanGTP. Danach kann das freigewordene Rev die RRE-RNA binden und es formiert sich der spätere Ribonukleoproteinkomplex zum anschließenden Kernexport.

Der Export von Rev erfolgt über den allgemeinen Proteinexportfaktor CRM1 (Fornerod *et al.*, 1997; Neville *et al.*, 1997). Im Kern bildet sich ein Komplex aus Rev, CRM1 und RanGTP, der durch den Porenkanal ins Zytoplasma transloziert. Im Zytoplasma kommt es durch zelluläre Faktoren, RanGAP1 und RanB1, zur Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP, wonach der Komplex zerfällt. Rev bindet Importin- β für den Kernreimport und gleichzeitig wird die virale RNA zur Translation freigesetzt. CRM1 ist deshalb essentiell für den Export von Rev und die Akkumulation der Rev-abhängigen mRNA im Zytoplasma (Fornerod *et al.*, 1997; Askjaer *et al.*, 1999). Folgerichtig verhindert Leptomycin B, ein spezifischer CRM1 Inhibitor, den nukleozytoplasmatischen Transport von Rev und somit die Expression von viralen Strukturproteinen (Wolff *et al.*, 1996; Wolff *et al.*, 1997). Es wurde eine direkte Bindung von Rev und CRM1 *in vitro* beschrieben, wobei die Bindungsaffinität zwischen Rev-NES und CRM1 äußerst gering ist (Askjaer *et al.*, 1999). Dies lässt auf weitere zelluläre Faktoren schließen, die für eine stabile Rev-CRM1 Bindung notwendig sind.

3.8.3 Rev Transaktivierung

Die Voraussetzung für die Rev Transaktivierung ist die Bindung des Proteins an die virale RRE-RNA, die Multimerisierung an der RNA und der aktive Kernimport und Export über Importin- β und CRM1 (siehe Absatz 2.8.2).

Es wurde mehrfach beschrieben, dass Rev für die zytoplasmatische Akkumulation der viralen 9 kb und 4 kb RNA unentbehrlich ist, die gespleißten 2 kb Transkripte allerdings auch ohne Rev ins Zytoplasma der infizierten Zelle transportiert werden (Felber *et al.*, 1989; Emerman *et al.*, 1989; Malim *et al.*, 1989b). Durch die Rev-regulierte Genexpression kommt es wie bereits erwähnt zu zwei zeitlich getrennten Phasen der viralen Genexpression. Zuerst findet eine frühe Rev-unabhängige Expression von Tat, Nef und Rev selbst statt, worauf eine späte Rev-abhängige Phase folgt. Während dieser werden Gag/Pol und Env exprimiert (Kim *et al.*, 1989). Das aktuellste Modell besagt, dass Rev die viralen RRE-RNA Spezies bindet und als Ribonukleoproteinkomplex über die Interaktion mit CRM1 und RanGTP den nukleozytoplasmatischen Export vermittelt. Dies erklärt die essentielle Rolle von Rev für die Expression der viralen Strukturproteine und damit für die virale Replikation (Pollard *et al.*, 1998).

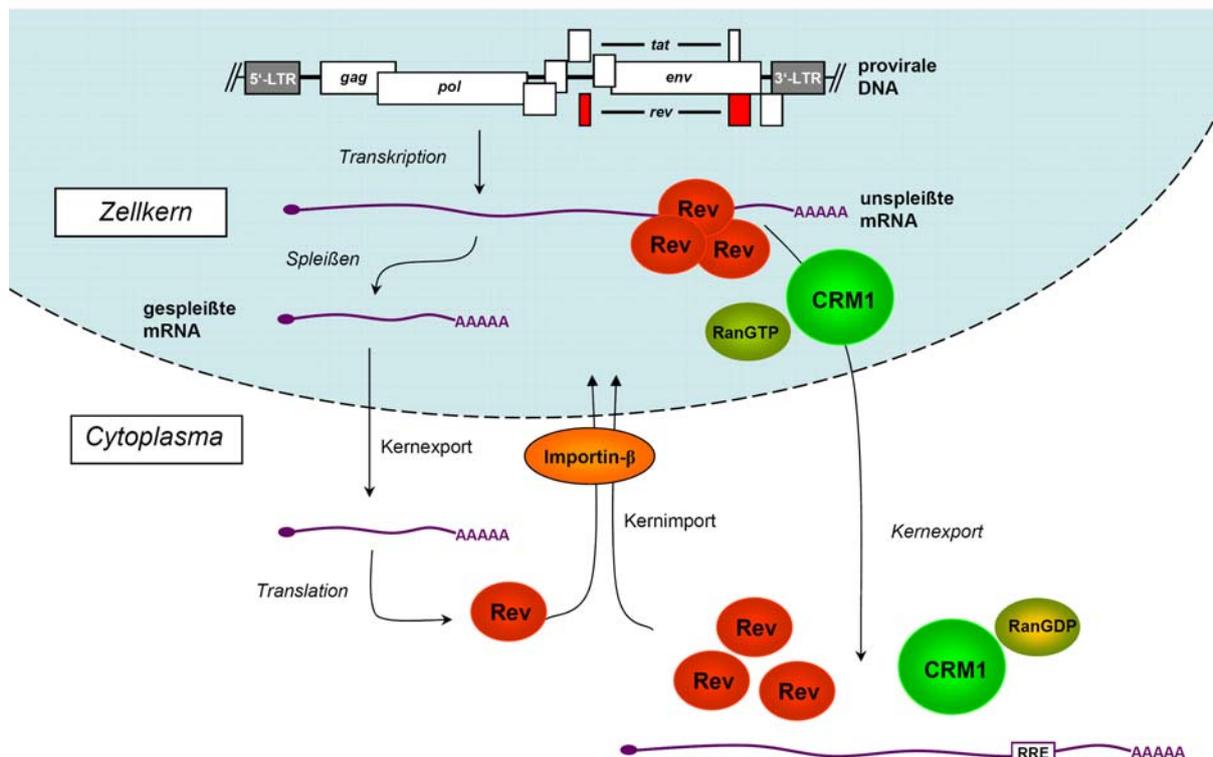


Abbildung 7: Modell der Rev Transaktivierung. In der frühen Phase kommt es zur Expression von Rev. Rev wird nach der Translation über Importin- β in den Kern transportiert. Dort bindet es an an das RRE der viralen mRNA, multimerisiert und der entstehende RNP Komplex wird über die Interaktion mit dem Kernexportrezeptor CRM1 und RanGTP ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma zerfällt der RNP Komplex durch die Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch Rev in den Zellkern reimportiert wird und die ungespleißte virale mRNA zur Translation bereitsteht.

Neben der Funktion, den Export der ungespleißten RNA zu vermitteln, wurden weitere posttranskriptionelle Funktionen von Rev beschrieben. Diese beeinflussen das Spleißen (Chang and Sharp, 1989a), die Stabilität (Malim *et al.*, 1993), die Polyadenylierung (Campbell *et al.*, 1994b), die Translation der viralen Transkripte (Arrigo and Chen, 1991a; Dagostino *et al.*, 1992) und die Verpackung der genomischen DNA in Viruspartikel (Brandt *et al.*, 2007).

Schon früh haben verschiedene Forschungsgruppen den Einfluss von Rev auf die Prozessivität des Spleißens der viralen mRNAs beschrieben. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass Rev das Spleißen verhindert, indem die Bindung von zellulären Faktoren der Spleißmaschinerie, sogenannte snRNPs, blockiert wird (Kjems and Sharp, 1993).

Andere Studien beschrieben einen indirekten Einfluss von Rev auf das Spleißen und verweisen auf die Spleißstellen der viralen RNA, die an sich nicht effizient von der Spleißmaschinerie erkannt werden (Mikaelian *et al.*, 1996). Hierbei kam es auch in der Abwesenheit von Rev zu großen Mengen an ungespleißter viraler RNA im Zellkern. Weiterhin wurde beschrieben, dass die Bindung von Rev an das RRE zur Stabilisierung der viralen RNA Spezies führt. Hierbei wurde in Anwesenheit von Rev die Halbwertszeit der ungespleißten 9 kb mRNA um ein Vielfaches erhöht (Felber *et al.*, 1989; Malim *et al.*, 1993). Bei der Retention der viralen RNA im Zellkern und deren raschen Abbau spielen die bereits erwähnten AU-reichen INS- und CRS-Elemente innerhalb der Intronsequenzen eine Rolle (Schwartz *et al.*, 1992).

Mehrfach wurde Rev auch eine Funktion bei der Translation der viralen RNA zugesprochen. Diese Studien beruhen auf der Beobachtung, dass in bestimmten Zelllinien und primären Zellen auch in Abwesenheit von Rev signifikante Mengen an ungespleißter RNA im Zytoplasma gefunden wurden, es aber trotzdem nicht zur Expression von viralen Strukturproteinen kam (Arrigo and Chen, 1991b; Dagostino *et al.*, 1992). Im einem vom RNA Kernexport unabhängigen Vaccina Virus System konnte Rev direkt die Translation der *env* RNA steigern (Perales *et al.*, 2005). Deshalb wurde angenommen, dass Rev einen Einfluss auf die Beladung der Polysomen mit viraler RNA ausübt.

Bei der Rev Transaktivierung handelt es sich vermutlich um eine Kaskade von posttranskriptionalen Ereignissen, die eine Inhibition des viralen RNA Spleißens, der Aktivierung des Kernexports von ungespleißter RNA und der Bereitstellung der mRNA für die Translation im Zytoplasma beinhaltet. Allgemein bleibt zu erwähnen, dass diese Prozesse in der Zelle nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können, da sie an einander gekoppelt sind (Reed, 2003).

Kürzlich wurde zudem eine direkte Funktion von Rev auf die Einkapselung von viraler genomischer RNA (gRNA) in Virionen beschrieben (Brandt *et al.*, 2007). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Rev unabhängig vom Kernexport der viralen Transkripte die Verpackung der RNA in Viruspartikel steigerte. Hierfür war allerdings auch die Bindung von Rev an das RRE der gRNA notwendig.

3.8.4 Rev Kofaktoren

In der Literatur werden neben CRM1 und RanGTP eine Vielzahl weiterer zellulärer Faktoren beschrieben, die einen Einfluss auf die Rev Transaktivierung ausüben (Suhasini and Reddy, 2009; Groom *et al.*, 2009b).

Als Rev Interaktionspartner wurde der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF5A) identifiziert (Ruhl *et al.*, 1993). Die genaue zelluläre Funktion von eIF5A, anfänglich als eIF4D bezeichnet, ist noch ungeklärt. Ursprünglich wurde dem Protein eine Rolle bei der Initiation der Translation zugeordnet (Park, 1989), was jedoch spätere Deletionsstudien in *Saccharomyces cerevisiae* nicht bestätigen konnten (Kang and Hershey, 1994). In UV *cross-linking* Experimenten konnte eine direkte Bindung zwischen der Aktivierungsdomäne von Rev und eIF5A gezeigt werden (Ruhl *et al.*, 1993). Durch Mikroinjektion von eIF5A in *Xenopus laevis* konnte die Rev Transaktivierung gesteigert werden und durch die Expression von *Antisense* RNA kam es zu einer Blockade bei Akkumulation der Rev-abhängigen mRNA im Zytoplasma (Ruhl *et al.*, 1993). In Lymphozyten konnte durch die konstitutive Expression von nichtfunktionalen eIF5A Mutanten die HIV-1 Virusreplikation inhibiert werden (Bevec *et al.*, 1996). Zudem ist eIF5A das einzige bekannte Protein, das die posttranslationale Aminosäuremodifikation eines Lysins zu Hypusin besitzt (Park *et al.*, 1996). Die Inhibition dieser Modifikation führt zur Hemmung der HIV Replikation (Hauber *et al.*, 2005). Das ribosomale Protein L5, welches im Kernexport von Polymerase III Transkripten involviert ist, wurde in *Yeast-Two-Hybrid* Versuchen und Kopräzipitationen als Interaktionspartner von eIF5A identifiziert. Die Expression führt zur Steigerung der Rev-abhängigen Gag Expression in Fibroblasten, wohingegen neutralisierende Antikörper gegen L5 und eIF5A den Rev-vermittelten RNA Export hemmten (Schatz *et al.*, 1998). Obwohl der molekulare Mechanismus von eIF5A bei der Rev Transaktivierung ungeklärt ist, wurde vermutet, dass eIF5A eine Adapterfunktion zwischen der Rev Transaktivierungsdomäne und CRM1 ausüben kann (Hofmann *et al.*, 2001).

Als weiterer Rev Kofaktor wurde in einem *Yeast-Two-Hybrid Screen* das zelluläre hRIP (*human Rev Interacting Protein*) oder Rab (*Rev activation domain-binding protein*)

identifiziert (Fritz *et al.*, 1995; Bogerd *et al.*, 1995). Eine direkte Wechselwirkung zwischen Rev und hRip konnte jedoch nicht gezeigt werden. Allerdings weisen RNAi Experimente und die Expression von Deletionsmutanten auf eine generelle Funktion von hRIP in der Rev-abhängigen Genregulation hin. Humanes RIP scheint hierbei eine Rolle bei der Freisetzung der viralen RNA von der perinukleären Region zu spielen, da es beim *Knockdown* von hRIP zu einer Akkumulation der Rev-abhängigen RNA in diesen Regionen kam (Sanchez-Velar *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005).

Mit den sogenannten DEAD box (Asp-Glu-Ala-Asp) Helikasen wurde eine Gruppe von RNA Helikasen als Rev Interaktionspartner beschrieben. DDX3 bindet direkt an CRM1 und spielt eine wesentliche Rolle bei dem CRM1-vermittelten Rev Transport. Durch den *Knockdown* der Helikase oder die Expression von dominant-negativen Mutanten kommt es zu keiner Akkumulation von Rev-abhängigen *gag* RNAs im Zytoplasma (Yedavalli *et al.*, 2004). Die Helikase DDX1 bindet direkt an das Rev-NLS und das RRE und steigert die Rev Transaktivierung. Die genaue Rolle von DDX1 bei der Transaktivierung ist in diesem Zusammenhang noch weitgehend ungeklärt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von DDX1 durch RNA Interferenz die subzelluläre Lokalisierung von Rev verändert. Rev befindet sich im Gleichgewichtszustand nicht mehr in den Nukleoli und dem Kern, sondern lokalisiert im Zytoplasma (Fang *et al.*, 2004). Ein weiteres Mitglied dieser Familie der RNA Helikasen, DDX24, bindet Rev und besitzt eine Funktion bei der Verpackung der genomischen HIV-1 RNA in Virionen (Ma *et al.*, 2008).

Große Bedeutung bei der Rev Transaktivierung wird auch dem zellulären Protein Sam68 zugemessen, obwohl seine genaue Funktion in der Literatur ebenfalls widersprüchlich ist. Sam68 (*68 kDa Src-associated substrate during mitosis*) ist ein nukleäres RNA-bindendes Protein mit einer hnRNP K homologen (KH) Domäne. Sam68 besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, die sich vorzugsweise im Tyrosin-reichen C-Terminus des Proteins befinden. Diese Tyrosine dienen zelluläre Kinasen, z.B. Src und Fyn, als Substrat, wobei es zur spezifischen Interaktion von Sam68 mit der SH2 und SH3 Domänen dieser Kinasen kommt. *In vitro* übt die Tyrosin Phosphorylierung einen negativen Einfluss auf die RNA Bindefähigkeit aus. Ebenso befindet sich im C-terminalen Teil das NLS, welches die Kernlokalisierung bewirkt (Lukong and Richard, 2003).

Anfänglich wurde mit Rev-abhängigen CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) Reportern gezeigt, dass Sam68 die Funktion von Rev ersetzen kann und es in Gegenwart von Rev durch direkte Interaktion zu einem synergistischen Effekt kommt. Diese Studien zeigten, dass Sam68 direkt an das RRE der ungespleißten RNA bindet und somit die Rev Funktion übernehmen kann (Reddy *et al.*, 1999). Allerdings berichteten andere Forschungsgruppen,

dass Sam68 auch RRE-unabhängig die Expression von ungespleißten RNAs steigert, die ein CTE oder kein posttranskriptionales Element besitzen (Hong *et al.*, 2002; Coyle *et al.*, 2003). Der *Knockdown* von Sam68 durch *Antisense* RNA führte zur Hemmung der Virusreplikation in 293T Zellen, Lymphozyten und peripheren Blutzellen (Li *et al.*, 2002a). Diese Inhibition wurde durch die stark verminderte Rev-abhängige Genexpression verursacht. Modem *et al.* (2005) führten diese Inhibition direkt auf einen verhinderten Export der ungespleißten RNA in Sam68 *Knockdown* Zellen zurück (Modem *et al.*, 2005). Die Rolle von Sam68 beim Export von ungespleißter RNA ist allerdings umstritten, da die exogene Expression von Sam68 nur zur minimalen Erhöhung des Exports von ungespleißter RNA führt und nicht im Einklang mit der enormen Steigerung der Partikelproduktion steht (Coyle *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde ein Einfluss von Sam68 auf die 3'-Prozessierung der neu synthetisierten mRNA gezeigt, der aber nicht zur erhöhten Akkumulation von ungespleißter RNA im Zytoplasma führte (McLaren *et al.*, 2004). Beide Gruppen vermuten einen Einfluss von Sam68 auf der Translationsebene der ungespleißten RNA. Sam68-NLS Mutanten (Sam68 Δ C) lokalisieren im Zytoplasma und führen zu einem transdominanten Phänotyp bei der Rev-RRE-vermittelten Genexpression (Reddy *et al.*, 1999). Die Lokalisation von Rev wird hierdurch nicht beeinflusst, aber die ungespleißte RRE-RNA wird in den perinukleären Regionen der Zelle, in sogenannten *Perinuclear Bundles*, zurückgehalten (Soros *et al.*, 2001). Sam68 Δ C Mutanten inhibieren darüber hinaus die Translation von *nef* RNA durch die Retention der vollständig gespleißten *nef* RNA in Stressgranuli. Die Translation von *rev/tat* RNA wird allerdings nicht beeinflusst (Heno-Mejia *et al.*, 2009).

Des Weiteren wurde beschrieben, dass die beiden Proteine SLM1 und SLM2 (*Sam68-like mammalian protein 1 and 2*) auf ähnliche Weise wie Sam68 stimulierend auf die Expression von ungespleißten RRE Transkripten wirken (Soros *et al.*, 2001). Auch von weiteren KH Domänen Proteine, sogenannte *Quaking* Proteine, wurde diese Aktivität berichtet (Reddy *et al.*, 2002).

Zusätzlich wurden viele weitere zelluläre Faktoren identifiziert, die einen Einfluss auf die Rev-RRE-vermittelte Genexpression ausüben. Pura stimuliert die Rev-abhängige Genexpression, indem es eine direkte Interaktion mit Rev und dem RRE eingeht (Kaminski *et al.*, 2007). Das ribonukleäre Protein hnRNPA1 bindet an Repressorsequenzen innerhalb der *gag* RNA und stimuliert die Rev Funktion (Najera *et al.*, 1999). Das Poly(A)-bindende Protein-1 (PABP1) assoziiert Rev-abhängig mit den viralen RNAs (Campbell *et al.*, 1994a) und dient als Initiationsfaktor der Translation (Kahvejian *et al.*, 2005). Die RNA Helikase A (RHA) bindet unter dem Einfluss von Rev an das RRE der HIV-1 RNA und erhöht deren Expression (Li *et al.*, 1999). Aktuelle genomweite RNAi Untersuchungen haben eine Vielzahl von weiteren zellulären humanen Faktoren identifiziert, die einen Einfluss auf die virale

Replikation ausüben (Konig *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). Allerdings ist ungeklärt, an welchen Stellen des Replikationszyklus sie eine entscheidende Funktion ausüben, mit welchen viralen Proteinen sie interagieren und ob es sich um einen virusspezifischen Einfluss handelt.

3.9 Therapie

Die klinische Behandlung von HIV-1 erfolgt durch die sogenannte HAART (*Highly Active Anti Retroviral Therapy*). Hierbei handelt es sich im Regelfall um die Verabreichung von mehreren Wirkstoffen, die sich gegen die virale Reverse Transkriptase und Protease sowie aktuell gegen die Integrase und den Eintritt des Virus in die Zelle richten. Durch die Therapie sind in den Industrieländern die Morbiditäts- und Mortalitätsraten zurückgegangen (Fauci, 2006). Auch in den von HIV stark betroffenen Entwicklungsländern, insbesondere in den Ländern Subsahara Afrikas, steigt die Prozentzahl an Personen, die eine Therapie erhalten. Hohe Arzneimittelkosten und die mangelhafte medizinische Infrastruktur verhindern allerdings eine flächendeckende Anwendung in den betroffenen Entwicklungsländern (www.unaids.org; Fauci, 2007).

Eine Impfung gegen das Virus oder eine Heilung durch Eradikation des Virus existiert bisher nicht. Bei der HAART treten oft starke Nebenwirkungen auf und bedingt durch hohe Mutationsraten des Virus ergeben sich Resistenzen gegen einen oder mehrere Wirkstoffe (Chen *et al.*, 2004; Johnston and Fauci, 2007). Dadurch besteht das allgemeine Interesse, neue antiretrovirale Medikamente und innovative Therapien zu entwickeln. Besonders Rev und Tat sind dabei vielversprechende Zielproteine für neue Medikamente, da beide von essentieller Bedeutung für die Virusreplikation sind. Bisher konnten keine spezifischen Wirkstoffe entwickelt werden, welche die Funktion der regulatorischen Proteine ohne signifikante Nebeneffekte hemmen. Neue Strategien verfolgen den Einsatz von Wirkstoffen gegen Wirtsproteine, die eine wichtige Rolle bei der HIV Replikation spielen. Da diese Wirkstoffe nicht direkt auf die Proteine des Virus wirken, kann dadurch besonders die Resistenzbildung umgangen oder minimiert werden (Hauber *et al.*, 2005; Arhel and Kirchhoff, 2010).

3.10 Aufgabenstellung

Das virale Rev Protein vermittelt den Kernexport von viraler ungespleißter und einfach-gespleißter RNA innerhalb des HIV-1 Replikationszyklus, damit diese im Zytoplasma zu den viralen Strukturproteinen translatiert bzw. als genomische RNA in Virionen verpackt werden

kann. Hierbei bindet Rev an das RRE innerhalb der viralen RNA und es kommt über die kooperative Bindung weiterer Rev Moleküle zur Formation eines oligomeren RNP Komplexes. Dieser interagiert mit dem Kernexportrezeptor CRM1 und weiteren, für die virale Genexpression wichtigen, zellulären Faktoren.

Ziel dieser Arbeit war, den Mechanismus der Rev Multimerisierung, welche essentiell für die biologische Aktivität von Rev ist, genauer zu verstehen. Hierbei sollte analysiert werden, wieviele Rev Moleküle für die Bildung eines funktionellen RNP Komplexes erforderlich sind. Desweiteren bestand die Aufgabe, die Rolle der Multimerisierung auf den Transport der viralen mRNA Klassen zu untersuchen. Bisher war unklar, ob bereits ein Monomer die virale RNA vor dem Spleißen und der Degradation schützen kann. Zusätzlich stellte sich die Frage, inwieweit die Rev Multimerisierung die Interaktion mit zellulären Kofaktoren, insbesondere mit CRM1, beeinflussen kann. Putative zelluläre Rev Kofaktoren sollten in einem nicht HIV-permissiven murinen Zellsystem identifiziert und ihre Funktion innerhalb der HIV Replikation näher charakterisiert werden.

4 Material

4.1 Bakterienstämme

(Escherichia coli)

Name	Herkunft	Genotyp
JM101	Stratagene	supE thi-1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI ^q ZΔM15]
XL 10-Gold [®]	Stratagene	Tet ^r Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]

4.2 Zelllinien

Name	Herkunft	Genotyp
HeLa	ATCC: CCL-2	humane epitheliale Cervixkarzinomzellen
HeLatTA	Gossen <i>et al.</i> , 1992	HeLa Zellderivat; Konstitutive Expression eines Fusionsproteins aus der Tet-Bindedomäne des Tet Repressors und dem VP16 Transaktivator
HLCD4-CAT	NIH Reagent #1299	HeLa Zellderivat mit einem integrierten CAT Gen unter der Kontrolle des HIV-1 LTR Promotors; Expression von CD4 auf der Oberfläche über retroviralen Gentransfer
COS-7	ATCC: CRL-1651	Fibroblastenzellen aus der Niere von <i>Cercopithecus aethiops</i> (Grüne Meerkatze), die das SV-40 T Antigen exprimieren
NIH3T3	ATCC: CRL-1658	murine embryonale Fibroblasten
293T	ATCC: CRL-11268	humanen embryonale Nierenepithelzellen, die das SV-40 T Antigen exprimieren
ACH-2	NIH Reagent #349	humane T-Lymphozytenzelllinie; HIV-1 infizierter Subklon von CEM (lymphoblastoide Leukämiezellen); konstante Virusproduktion

4.3 Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
Parentale Vektoren		
pBC12/CMV		Cullen <i>et al.</i> , 1986
pcDNA3		Invitrogen
pUHC	Derivat des pUHD13-3 Vektors	Gossen and Bujard, 1992
pECFP-N1		Clontech
pEYFP-N1		Clontech

Konstruktnamen	Beschreibung/ Vektor	Referenz/ Herkunft
Reporterkonstrukte		
pDM128 /RRE	pBC12/CMV Vektor mit CAT Kasette flankiert von HIV-1 5' SD und 3' SA ; RRE	Hope <i>et al.</i> , 1990 ; Malim <i>et al.</i> , 1991
pCAT/SLIIB	pBC12/CMV mit CAT Kasette, HIV-1 LTR Promotor mit Substitution der TAR durch SLIIB	Tiley <i>et al.</i> , 1992
pHXB2ΔBam	Proviraies Genom von HIV-1 HXB2 mit Mutation in der Rev Exon1 Sequenz	Feinberg <i>et al.</i> , 1986
pHXB2gpt	Proviraies Genom von HIV-1 HXB2	Feinberg <i>et al.</i> , 1986
pGPV-RRE	s. Abbildung 22	Swanson <i>et al.</i> , 2004
pGPV-4xCTE		
pGPV-Δ		
pUHC-HXB2ΔBam	HXB2ΔBam Sequenz ohne 5'-LTR aus pHXB2ΔBam; Ligation über NotI/XbaI in den pUHC-Vektor, CMV-IE / tetO7-Promotor	s. 4.1.8.
Interne Kontrollen		
pβ-GAL	pBC12/CMV; kodiert für die Galactosidase auf gespleißter mRNA	Ruhl <i>et al.</i> , 1993
pSEAP	pBC12/CMV kodiert für die sekretierte alkalische Phosphatase auf gespleißter mRNA	Berger <i>et al.</i> , 1988

Konstruktnamen	Beschreibung/ Vektor	Referenz/ Herkunft
Rev Mutanten		
pRev	pBC12/CMV	Malim <i>et al.</i> , 1988
pRevSLT40	pBC12/CMV	Thomas <i>et al.</i> , 1998
pZipRevSLT40	Fusion des GCN4 Leuzin Zippers an den N-Terminus von RevSLT40	Hauber
pRevM10	pBC12/CMV	Malim <i>et al.</i> , 1989
pTatRevWT	pBC12/CMV; Konstrukte für den <i>in vivo</i> RRE Bindungsassay	Tiley <i>et al.</i> , 1992
pTatRevM5		Tiley <i>et al.</i> , 1992
pTatRevSLT40		Thomas <i>et al.</i> , 1998
pTatZipRevSLT40		Hauber/ Schwark
pTatRevSLT40M10		s.4.1.8.

Konstruktnamen	Beschreibung/ Vektor	Referenz/ Herkunft
pECFP-RevWT	C-terminale Rev-CFP/YFP Fusionskonstrukte; Ligation von Rev über NheI/ AgeI in pECFP-N1 oder pEYFP-N1	s. 5.1.8.
pECFP-RevSLT40		
pECFP-ZipRevSLT40		
pECFP-RevM10		
pEYFP-RevWT		
pEYFP-RevSLT40		
pEYFP-ZipRevSLT40		
pEYFP-RevM10		
pEN-F1-RevWT	N-terminale Fusion der Heterodimerisierungsmotive EN-F1 und RHE an die Rev Mutanten; Ligation über HindIII/ NheI in pRev Konstrukte	
pEN-F1-RevSLT40		
pEN-F1-ZipRevSLT40		
pEN-F1-RevM10		
pEN-F1-RevSLT40M10		
pRHE-RevWT		
pRHE-RevSLT40		
pRHE-ZipRevSLT40	N-terminale Fusion der Homodimerisierungsdomäne FKBPV36 an die Rev Mutanten;	
pRHE-RevM10		
pRHE-RevSLT40M10		
pFKBP-RevWT		Hauber/ Schwark
pFFBP-RevSLT40		

Konstruktnamen	Beschreibung/ Vektor	Referenz/ Herkunft
Zelluläre Kofaktoren		
p3-Flag-mSam68	murines Sam68 mit N-terminalen Flag-Tag ; Ligation über HindIII/Sall in pcDNA3	s. 5.1.8.
p3-Flag-hSam68	humanes Sam68 mit N-terminalen Flag-Tag ; Ligation über HindIII/Sall in pcDNA3	

Konstruktnamen	DNA Sequenz/ Vektor	Referenz/ Herkunft
Lentivirale Vektoren und Verpackungsplasmide		
pLKO.1-SD shRNA	Kontrollplasmid für scrambled duplex shRNA	MISSION® shRNA Sigma
pLKO.1-Sam68 shRNA.1	ACGGCAGAAATTGAGAAGAT	
pLKO.1-Sam68 shRNA.2	ATGAGGAGAATTACTTGGAT	
pLKO.1-SLM2 shRNA.1	GCTGGGACAGAAGTGTTAAT	
pLKO.1-SLM2 shRNA.2	GTGGACTAACTCAAGACACAA	
pMDLg/pRRE	Expressionsvektor für Gag/Pol	Dull <i>et al.</i> ; 1998
pCMV-VSV-G	Expressionsvektor für das G-Protein des VSV	Beyer <i>et al.</i> ; 2002
pRSV-Rev	Expressionsvektor für Rev	Dull <i>et al.</i> ; 1998

4.4 Oligonukleotide

Name	DNA Sequenz in 5' – 3' Richtung
Klonierung	
FRET_1	AATTTAAAGCTTACTAGTACCATGGCAGGAAGAAGCGGAG
FRET_2	AATTTAACCGGTGCACCTGCTCCTTCTTTAGCTCCTGACTC
FRET_3	AATTTAAAGCTTACTAGTACCATGGACCCGAAACTGCAGCG
EN-F1_s	ATTTAAAAGCTTTGGTATG GGAGTGCAGGTGGA AAC
EN-F1_as	ATTTAAGCTAGCGCCGCCCTTCCAGTTTTAGAAAGCTCCAC
RHE_s	ATTTAAAAGCTTTGGTATGGCTTCTAGAATCCTCTG
RHE_as	ATTTAAGCTAGCGCCGCCCTTTGAGATTCGTGCGAACAC
Rev_s	ATTTAAGCTAGCGCAGGAAGAAGCGGAGAC
Rev_as	ATTTTACTCGAGCTATTCTTTAGCTCCTGACTCCAATATTG
Rev_SLT40M10_as	ATTTTATAAGTCTCAGATCTGGTGGTAGCTGAAGAGG
HXB2_s	ATTTAGCGGCCGCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAG
HXB2_as	ATTTATCTAGATGCTAGATGCTAGAGATTTCCACACTGACTAAAAGG
hSam68_s	ATTTAAGGATCCATGGGAGGCGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGAG GAGAATTCATGCAGCGCCGGGACGACCCC
hSam68_as	ATTTAAGTCGACATAACGTCCATATGGGTGCTCTCTG
mSam68_s	ATTTAAGGATCCATGGGAGGCGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGAG GAGAATTCATGCAGCGCCGGGACGATCCTG
mSam68_as	ATTTAAGTCGACATAACGTCCATATGGATGCTCTCTG

Name	DNA Sequenz
Realtime RT-PCR	
gag s	GCAGGACTCGGCTTGCTGAA
gag as	AGGATTAAGTGC GAATCGTTCTA
gag-Sonde	FAM- TTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA -TAMRA
env s	GCAGGACTCGGCTTGCTGAA
env as	GCTACTACTAATGCTACTATTGCT
env-Sonde	FAM- AACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTAT -TAMRA
tat s	GCAGGACTCGGCTTGCTGAA
tat as	TGTTGCTTTTCATTGCCAAGTTTG
tat Sonde	FAM- ACATAGCAGAATAGGCGTTACTCGACA -TAMRA
SLM2_s	GATGAGATCAGGCAAGCACAG (Cohen <i>et al.</i> , 2005)
SLM2_as	GCTGGTACACCTCTTGTACG (Cohen <i>et al.</i> , 2005)
SLM2-Sonde	FAM- CCACGTGGCAATTCTCTGAAGCGTTTA –TAMRA (Cohen <i>et al.</i> , 2005)
GAPDH s	GTCATCAATGGAAATCCCATCA-
GAPDH as	TGGTTCACACCCATGACGAA
GAPDH-Sonde	FAM- TCTTCCAGGAGCGAGATCCCTC -TAMRA
RT-PCR	
Sam68 s	TGACGGCAGAAATTGAGAAG
Sam68 as	CCAAGAATCTTCCCCACAAA
SLM1 s	CACGTATGAGTCATGCATTGGAAGAGA (Wang <i>et al.</i> , 2002a)
SLM1 as	TATCTACCATAGGGGTGTTCCCTGTAT (Wang <i>et al.</i> , 2002a)
SLM2 s	CCGTAAAACAGTTCCCTAAGTTCAAC (Cohen <i>et al.</i> , 2005)
SLM2 as	GCTGGTACACCTCTTGTACG (Cohen <i>et al.</i> , 2005)
GAPDH s	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT
GAPDH as	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC
Slot Blot	
U6-Sonde	GAACGCTTCACGAATTTGCGT

4.5 Antikörper

α -Rev 8H12	monoklonaler Antikörper gegen HIV-1 Rev aus der Maus (Hammerschmid <i>et al.</i> , 1994) 1:1000 Verdünnung für indirekte Immunfluoreszenz 1:3000 Verdünnung für Western Blot Analysen
α -CA 183	monoklonaler Antikörper gegen HIV-1 p24 (Kapsid), gereinigt aus Hybridomazellen <i>NIH AIDS Research & Reference Reagent Program</i> Western Blot 1:3000 p24 Antigen ELISA: 1:5000
α -CA	polyklonaler Antikörper gegen p24 (Kapsid) von HIV-1; aufgereinigt aus Kaninchenserum, immunisiert mit rekombinaten p24 (Kapsid) (Firma David Regensburg) p24 Antigen ELISA: 1:10000
α -Sam68 (C-20)	polyklonaler Antikörper gegen Sam68 aus dem Kaninchen (Santa Cruz) Western Blot 1:4000
α -SLM2	polyklonaler Antikörper gegen SLM2 aus dem Kaninchen (Sigma) Western Blot 1:1000
α -Tubulin	polyklonaler Antikörper gegen Tubulin aus der Maus (Sigma) Western Blot 1:5000
α -GAPDH	polyklonaler Antikörper gegen GAPDH aus dem Kaninchen (Sigma) Western Blot 1:4000
α -Aktin	polyklonaler Antikörper gegen Aktin aus der Maus (Sigma) Western Blot 1:4000

Enzym-gekoppelte sekundäre Antikörper

α -Kann IgG HRPO	polyklonaler Antikörper gegen Kanninchen IgG aus der Ziege (Dianova); p24 Antigen ELISA 1:2000
-------------------------	--

Fluoreszenz-gekoppelte sekundäre Antikörper für Western Blot

IRDye 700DX Goat anti-Mouse IgG (H + L) Li-Cor
IRDye 700DX Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Li-Cor
IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L) Li-Cor
IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Li-Cor
 Jeweils 1:10000 Verdünnung

Fluoreszenz-gekoppelte sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

α -Maus IgG-Cy2	Rockland	1:500
------------------------	----------	-------

4.6 Enzyme

Restriktionsenzyme	NEB
Terminale Transferase	Roche
Phusion® Polymerase	Finnzyme
Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB
RQ1 RNase free DNase	Promega
M-MLV RT	Promega

4.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche Chemikalien wurden von den Firmen Biomol, Merck, Sigma und Serva, die Radiochemikalien von den Firmen Hartmann Analytics und MP Biomedicals bezogen. Verbrauchsmaterial und Plastikwaren stammten von den Herstellern Greiner, Nunc, Renner und Sarstedt. Röntgenfilme wurden von GE Health Care bezogen.

4.8 Puffer und Lösungen

PBS	17 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.2); 120 mM NaCl	
PBS-T	PBS; 0,05% Tween 20	
TAE (50x)	2,0 M Tris (pH 7.4); 1 M Na-Acetat; 50 mM EDTA	
DNA Ladepuffer (10 x)	50% Glycerin; 20 mM EDTA; 0,01% Bromphenolblau	
TBS (10x)	100 mM Tris (pH 8.0); 1,5 M NaCl	
TBS-T	1 x TBS; 0,2% Tween 20	
E1A Lysepuffer	50 mM HEPES (pH 7.5); 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) NP-40; Protease Inhibitoren	
Protease Inhibitoren:	- Aprotinin (1000 x)	5 mg/ml in 50% Glycerin/ PBS
	- Leupeptin (1000 x)	5 mg/ml in 50% Glycerin/ PBS
	- Pepstatin A (200 x)	1 mg/ml in Methanol
	- Pefabloc (200 x)	25 mg/ml 50% Glycerin/ PBS
SDS-Ladepuffer (6x)	250 mM Tris (pH 6.8); 10 % (w/v) SDS; 36 % (v/v) Glycerin; 600 mM DTT; 0,01% Bromphenolblau	

SDS Trenngelpuffer	1,875 M Tris (pH 8.8)
SDS Sammelgelpuffer	250 mM Tris (pH 6.8)
SDS Laufpuffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS
Western Blot Puffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS; 20% Methanol
Ponceau S	2% (w/v) Poceau S; 30% (w/v) Trichloressigsäure; 30% (w/v) Sulfosalicylsäure
FACS Puffer	PBS; 1% FKS; 5 mM EDTA
Fraktionierungspuffer	10 mM HEPES (pH 7.8); 10 mM KCl; 20% Glyzerin; 0,25 % NP-40; 1 mM DTT
SSC (20x)	0,3 M NaCitrat (pH 7.0); 3 M NaCl
Denhardt's Puffer (100x)	2% (w/v) Ficoll Type 400; 2% BSA; 2% Polyvinylpyrrolidone
Hybridisierungspuffer	20% SDS; 5 x SSC; 10 x Denhardt's Puffer; 10% (w/v) Dextransulfat; 20 mM Na-phosphatpuffer (pH 7.0); 100 µg/ml Lachssperma DNA (Sigma D1626 in 80% Formamid, 20% TE)
Waschmix 1	3 x SSC; 20% SDS; 20 mM Na-phosphatpuffer (pH 7.0); 10 x Denhardt's Puffer
Waschmix 2	1 x SSC; 20% SDS
SEAP Puffer	2 M Diethanolamin ACS reagent; 2 mM Magnesiumchlorid; 20 mM L-Homoarginin
Z Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ ; 40 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM KCl; 1 mM MgSO ₄ ; 0,008% SDS; 40 mM Mercaptoethanol
Mowiol	0,2 M Tris-HCl (pH 8.5); 12% (w/v) Mowiol 4-88 (Calbiochem); 30% (w/v) Glycerin

4.9 Kits

Plasmid Mini Kit	QIAGEN
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction	QIAGEN
Rapid Ligation Kit	Roche
5 PRIME MasterMix	5 PRIME
CAT ELISA	Roche
Paltinum® QPCR UDG Master Mix	Invitrogen

4.10 Medien

Medien für Bakterienstämme

LB Medium	10 g/l Bacto Trypton; 5 g/l Bacto Hefeextrakt; 8 g/l NaCl; 1 g/l Glukose (pH 7.2); autoklaviert
LB Agarplatten	15 g Agar in 1 l LB Medium gelöst und autoklaviert

Medien für Zelllinien

DMEM Medium	DMEM (Biochrom); 10% FKS (Biochrom); 0,375% NaHCO ₃ ; 1 mM Natriumpyruvat (Biochrom); 3 mM Glutamin (Biochrom)
RPMI Medium	10% FKS (Pan-Biotech); 1 mM Natriumpyruvat (Biochrom); 3 mM Glutamin (Biochrom)
Opti-MEM®	Invitrogen

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 PCR

Bei der PCR (*Polymerase Chain Reaction*) wurden spezifische DNA Sequenzen *in vitro* amplifiziert. In einem zyklischen Prozess, der sich aus Denaturierung, *Primer Annealing* und Elongation zusammensetzte, kommt es zur Amplifizierung der spezifischen DNA im PCR *Cycler* (Gene Amp® PCR System 9700 / Applied Biosystems). Vor dem Start der Zyklen wurde die *template* DNA für 3 min bei 96°C denaturiert. Bei jedem Zyklus betrug die Denaturierung danach 30 sec bei 96°C. Die *Annealing* Temperatur richtete sich nach der Länge und der Nukleotid Zusammensetzung der Oligonukleotide. Die Elongationszeit wurde anhand der Größe des Amplifikats gewählt mit 30 sec pro 1 kbp. Bei den Polymerasen handelte es sich um hitzestabile Enzyme, die bei 72°C arbeiten und sich durch eine hohe Prozessivität und Genauigkeit auszeichnen.

Zur Amplifizierung einer bestimmten DNA Sequenz wurden *Sense* und *Antisense* Primerpaare entworfen und bei der Firma Sigma Genosys synthetisiert. Zur Herstellung von Expressionskonstrukten wurden die *Primer* mit Überhängen für Restriktionsschnittstellen konstruiert. Hierdurch konnte das PCR Produkt in einen Plasmidvektor mit *Multiple Cloning Site* (MCS) ligiert werden. Anhand des Designs der Oligonukleotide konnten auch Sequenzen für Epitop *Tags*, wie z.B. Flag, in die Expressionskonstrukte eingebracht werden.

5.1.2 Agarose Gelelektrophorese

Mit der Agarose Gelelektrophorese wurden DNA Moleküle präparativ und analytisch in 1 – 2% Gelen aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA Moleküle wandern in Richtung Anode und wurden durch den Ogston Siebeffekt aufgetrennt. Lineare DNA wandert schneller als entspannte zirkuläre DNA und langsamer als zirkuläre *supercoiled* DNA.

Zur Markierung der DNA befand sich im Agarosegel Ethidiumbromid, welches in Doppelstrang DNA interkaliert und die DNA Banden unter UV Licht visualisiert. Zur Abschätzung der Größe und der Konzentration von linearisierter DNA wurde ein DNA Standard Marker (NEB) aufgetragen.

5.1.3 DNA Gelextraktion und Aufreinigung von PCR Produkten

Um linearisierte Vektor DNA oder PCR Produkte aufzureinigen, wurden diese standardmäßig in 1,5% Agarosegelen aufgetrennt. Die Banden wurden unter UV Licht präzise aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gel Extraction Kit (QIAGEN) extrahiert und aufgereinigt.

5.1.4 Restriktionsverdau

Bei den Restriktionsenzymen handelte es sich um Endonukleasen, die DNA Sequenzen hochspezifisch an ihrer Erkennungssequenz schneiden. Die Erkennungssequenzen sind palindromisch aufgebaut und umfassen vier bis acht Nukleotide. Durch die Spaltung einer Phosphodiesterbindung entstehen DNA Fragmente mit überhängenden Enden (*sticky ends*) mit 5'-Phosphatgruppe und 3'-Hydroxylgruppen.

Bei der Klonierung wurden die Insert DNA und der Vektor mit den kompatiblen Restriktionsenzymen behandelt, wodurch überhängende Enden an die komplementären Basen hybridisieren konnten.

Beim analytischen Restriktionsverdau wurde Plasmid DNA aus der Mini Präparation mit Restriktionsenzymen versetzt, um Insert und Vektor Größe zu kontrollieren.

5.1.5 Ligation

Bei der Ligation wurde das Rapid Ligation Kit (Roche) verwendet, wodurch Insert und Vektor DNA durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft wurden. Unter ATP Verbrauch prozessiert die Ligase die Veresterung der 5'-Phosphatgruppe mit der 3'-Hydroxylgruppe.

5.1.6 Transformation der Plasmide in E. coli

Bei der Transformation wurde rekombinante Plasmid DNA in Bakterien eingeschleust. Durch unphysiologisch hohe Mengen an Ca^{2+} -Ionen wurde die Membran destabilisiert und die *E. coli* Zellen für die Transformation vorbereitet. Die chemisch-kompetenten Bakterien wurden mit Plasmid DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42°C und eine Inkubation für 2 min auf Eis. Anschließend wurden die Bakterien in LB Medium ohne Antibiotikum vorkultiviert. Das Plasmid vermittelte hierbei eine Antibiotikaresistenz, wodurch transformierte Bakterien selektiert werden konnten. Dazu wurden die *E.coli* Stämme XL-10 Gold und für provirale Konstrukte JM101 verwendet.

5.1.7 Mini und Maxi Plasmidpräparation

Die Plasmid Präparation diente zum Schnellaufschluß von Bakterienkulturen und zur Gewinnung von Plasmid DNA für analytische oder präparative Zwecke. Die Methode basiert auf dem Prinzip einer alkalischen Lyse mit selektiver Denaturierung und Renaturierung von Plasmid DNA. Die Isolierung der DNA erfolgte nach den Herstellerangaben des Mini Prep und Maxi Prep Kits (QIAGEN).

5.1.8 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die verschiedenen Konstrukte wurden über die Subklonierung von cDNA oder Plasmid DNA in Expressionsvektoren generiert. Die kodierenden Sequenzen wurden mit Oligonukleotiden über PCR mit der Phusion[®] Polymerase (Finnzyme) nach Herstellerangaben amplifiziert. Die über Gelelektrophorese aufgereinigten Amplifikate wurden über homologe Schnittstellen in die zuvor linearisierten Expressionsvektoren ligiert und in *E.coli* Stämme transformiert. Die entsprechenden Klone wurden von den Agarplatten gepickt, die Plasmid DNA isoliert und danach über Restriktionsanalyse und Sequenzierung (Seqlab) verifiziert.

5.1.8.1 Konstruktion der pRev-CFP und pRev-YFP Plasmide

Zur Generierung der Rev-CFP und Rev-YFP Fusionsproteine wurden die kodierenden Rev Sequenzen über PCR mit den Oligonukleotiden FRET_1 und FRET_2 aus pRevWT, pRevSLT40 und RevM10 bzw. FRET_3 und FRET_2 aus pZipRevSLT40 amplifiziert und über NheI und AgeI in die Vektoren pECFP-N1 und pEYFP-N1 ligiert.

5.1.8.2 Konstruktion der EN-F1-Rev und pRHE-Rev Plasmide

Die Rev Heterodimerisierungskonstrukte wurden über die Konstrukte pFKBP-RevWT und pFKBP-RevSLT40 generiert. Hierfür wurden die Motive aus den Expressionsvektoren pC4EN-F1E und pC4RHE (ARIAD) über PCR mit den Oligonukleotiden EN-F1_s und EN-F1_as bzw. RHE_s und RHE_as amplifiziert. Über die Restriktionsschnittstellen HindIII und NheI wurde das FKBP Motiv in FKBP-RevWT und FKBP-RevSLT40 durch die Motive EN-F1 und RHE ausgetauscht. Für pEN-F1-RevM10 und RHE-RevM10 wurde die kodierende Sequenz mit den Oligonukleotiden Rev_s und Rev_as aus pRevM10 amplifiziert und über NheI und XhoI anstelle der RevWT Sequenz in die Vektoren pEN-F1 und pRHE ligiert. Für RevSLT40M10 wurde über die Primer Rev_s und RevSLT40M10_as die Mutation

I59D/I60D in RHE-RevM10 eingefügt. Die Ligation erfolgte über die NheI und BglII Restriktionsschnittstellen.

5.1.8.3 Konstruktion von pUHC-HXB2ΔBam

Zur Herstellung des Reporterkonstrukts pUHC-HXB2ΔBam für *transcriptional pulse* Studien wurde das provirale Rev-defiziente Genom ohne 5'-LTR mit den Primern HXB2_s und HXB2_as aus dem Plasmid pHXB2ΔBam amplifiziert. Über die Schnittstellen NotI und XbaI wurde die Sequenz in den Vektor pUHC ligiert und in JM101 transformiert.

5.1.8.4 Konstruktion von p3-Flag-mSam68 und p3-Flag-hSam68

Für die Herstellung der murinen und humanen Sam68 Expressionsplasmide wurde Gesamt-RNA aus NIH3T3 und HeLa Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Sam68 cDNA wurde über PCR mit den Primern mSam68_s und mSam68_as bzw. hSam68_s und hSam68_as amplifiziert und über HindIII und Sall in die Schnittstellen HindIII und XhoI in den pcDNA3 Vektor ligiert. Zusätzlich wurde über die Primer am 5'-Ende der Sam68 cDNA eine Flag-Tag Sequenz eingefügt.

5.1.9 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der zellulären RNA wurde das auf Phenol/Guanidiniumthiocyanat/Chloroform-basierende System TriFAST (Peqlab) verwendet. Die RNA Extraktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in ultrareinem Wasser für 10 min bei 65°C gelöst. Im ersten Schritt wurde bedingt durch Transfektionsexperimente exogene Plasmid DNA mitaufgereinigt. Für die folgenden RT-PCR Studien wurde diese mit 1 U RQ1 DNase (Promega) nach Herstellerangaben verdaut. Die RNA wurde danach erneut durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- (25:24:1) Extraktion aufgereinigt, in 50% Propanol gefällt, bei 12.000 x g 30 min pelletiert und mit 80% Ethanol gewaschen. Die isolierte hochreine RNA wurde anschließend für 10 min bei 65°C gelöst.

5.1.10 Fraktionierung von nukleärer und zytoplasmatischer RNA

Für die Fraktionierung der Zellen in nukleäre und zytoplasmatische Kompartimente wurden die transfizierten Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, und mit kaltem PBS gewaschen. In

einem ersten Schritt wurden die Zellen unter milden Bedingungen im Fraktionierungspuffer aufgeschlossen und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand enthielt die zytoplasmatische Fraktion, welche in TriFAST zur RNA Isolierung aufgenommen wurde. Die verbleibende unlösliche Fraktion aus Zelldebris und Kernen wurden im Fraktionierungspuffer rigoros resuspendiert, um zuvor nicht aufgeschlossene Zellen zu lysieren und eine Verunreinigung der nukleären Fraktion mit zytoplasmatischer RNA auszuschließen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 500 x g für 5 min wurde der klare Überstand verworfen. Die im Pellet verbleibenden Zellkerne wurde in TriFAST aufgenommen und die RNA wurde isoliert.

5.1.11 Reverse Transkription der mRNA

Die isolierte RNA wurde mit der Reversen Transkriptase des M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus/Promega*) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Als Primer diente ein poly(15)dT Oligonukleotid, wodurch alle polyadenylierten mRNAs revers transkribiert wurden. Hiefür wurde die Konzentration der isolierten RNA bei 260/280 nm photometrisch bestimmt und 1 µg Gesamt-RNA pro Reaktion eingesetzt. Die reverse Transkription erfolgte im PCR Cycler für 25 min 95°C, 90 min 42°C und 5 min 95°C (Gene Amp® PCR System 9700/Applied Biosystems). Die transkribierte cDNA konnte direkt für die semiquantitative RT-PCR oder *Realtime* RT-PCR eingesetzt werden.

5.1.12 Semiquantitative RT-PCR

Für die semiquantitative PCR wurde standardmäßig 200 ng umgeschriebene mRNA eingesetzt. Über die spezifischen Oligonukleotide konnte die zu untersuchende cDNA mit dem 5-PRIME MasterMix über PCR amplifiziert und das Expressionsniveau im Agarosegel detektiert werden. Die Anzahl der Zyklen richtete sich nach der Expressionsstärke der zu untersuchenden Gene und musste zuvor experimentell bestimmt werden. Zur internen Kontrolle wurde die Expression der endogenen GAPDH mRNA untersucht.

5.1.13 Quantitative *Realtime* RT-PCR

Die Expression viraler und zellulärer mRNAs wurde mit der *Realtime* RT-PCR analysiert. In der *Realtime* PCR wurden typischerweise Amplifikate von 50 – 150 bp mit dem Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG Kit (Invitrogen) untersucht. Die Quantifizierung erfolgte über die Detektion von Fluoreszenzsignalen, die proportional zur Menge an

neusynthetisierter DNA waren. In den Versuchen wurde SYBR Green verwendet, welches erst durch die Interkalation in doppelsträngiger DNA fluoresziert, oder eine fluoreszenzmarkierte Taqman Sonde, die durch ihren Abbau über die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase Photonen emittiert. Als Standard wurde das entsprechende Expressionsplasmid verwendet. Die Menge an GAPDH diente als interne Kontrolle. Für die Auswertung wurden die Expressionsniveaus der untersuchten mRNAs hieran angepasst. Die Analyse erfolgte mit dem 7500 FAST *Realtime* PCR System (Applied Bioscience).

5.1.14 *Slot* Blot mit den subzellulären RNA Fraktionen und Hybridisierung mit einer radioaktiven U6-Sonde

Für die Analyse des mRNA Exports war es wichtig, dass die zytoplasmatische Fraktion nicht mit RNA aus dem Zellkern kontaminiert war.

Zur Fraktionierungskontrolle wurde die nukleäre und zytoplasmatische RNA im *Slot* Blot mit einer radioaktiven Sonde für kernständige U6-RNA überprüft. Es wurde dazu 1 µg isolierte RNA mit der *Slot* Blot Apparatur auf eine Nitrocellulosemembran immobilisiert und durch UV Bestrahlung mit der Membran verknüpft.

Für die Sonde wurden 20 ng Oligonukleotid mit [α -³²P] ATP und terminaler Transferase (Roche) nach Herstellerangaben durch Polyadenylierungsreaktion markiert und über eine Sephadex Säule (GE Healthcare) aufgereinigt.

Die Membran wurde in Glasröhren im Hybridisierungspuffer bei 55°C geblockt und anschließend mit der U6-Sonde in Hybridisierungspuffer für 16 h bei 55°C inkubiert. Danach wurde die Membran mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 für 30 min bei 55°C gewaschen. Das U6-Signal wurde mit einem Röntgenfilm detektiert.

5.2 Proteinbiochemische Methoden

5.2.1 Herstellung des Gesamtzelllysats

Adhärente Zellen wurden durch Trypsin/EDTA Behandlung abgelöst, mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in E1A Lysepuffer mit Protease Inhibitoren aufgeschlossen. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 10 Impulsen (Duty Cycle 80%; Output control 8 Micro Top Limit) im Sonifier 450 (Branson) bei 4°C sonifiziert. Das Zelldebris wurde bei 20000 x g und 4°C pelletiert und die Proteinkonzentration des klaren Zelllysats nach Bradford (Bio-Rad Protein Assay) quantifiziert. Für die Analyse der Proteinexpression wurde die Lysate auf eine einheitliche Konzentration eingestellt.

5.2.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS, ein anionisches Detergenz, überdeckt effektiv die Eigenladung und DTT löst die Proteindisulfidbrücken auf. Die Proteinproben wurden im SDS Ladepuffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht.

Für die diskontinuierliche SDS Gelelektrophorese wurden 0,75 mm Polyacrylamid Gele, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, vorbereitet. Die Zusammensetzung ist nachfolgend tabellarisch aufgelistet. Die Acrylamidkonzentration für das Sammelgel richtete sich nach den molekularen Massen der zu analysierenden Proteine. Zur Größenkontrolle wurde ein Proteinstandard (Bench Mark® *Page Ruler™ Prestained*, Invitrogen) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Stromstärke von 15 mA für das Sammelgel und 25 mA für das Trenngel im SDS Laufpuffer.

Sammelgel (10ml)	10%	15%	Trenngel (5ml)	
Dest. Wasser	3,1 ml	2,1 ml	Dest. Wasser	3,2 ml
Sammelgelpuffer	2,8 ml	2,8 ml	Trenngelpuffer	0,65 ml
30% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	4 ml	5 ml	30% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	0,65 ml
SDS (10%)	100 µl	100 µl	SDS (10 %)	0,5 ml
TEMED	20 µl	20 µl	TEMED	15 µl
APS (40%)	20 µl	20 µl	APS (40 %)	15 µl

5.2.3 Western Blot (*Semi-dry*)

In der Western Blot Analyse wurden die im SDS Gel aufgetrennten Proteine mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose Membran (Schleicher & Schuell) immobilisiert. Die zu untersuchenden Proteine wurden anschließend über Immundetektion visualisiert.

In der *Blotting* Apparatur, bestehend aus einem im Western Blot Puffer getränkten Stapel aus Whatman Papier, Nitrocellulosemembran, SDS Gel und Whatman Papier, erfolgte der Transfer und die Immobilisierung auf die Membran. Zur Immundetektion wurde die Membran mit 5% Milchpulver/TBS-T geblockt und danach mit proteinspezifischen Primärantikörpern, welche zuvor in 5% Milchpulver/TBS-T verdünnt wurde, inkubiert. In einem zweiten Schritt wurden polyklonale Sekundärantikörper in 5% Milchpulver/TBS-T an die Primärantikörper gebunden. Die sekundären Antikörper waren Fluorophor-gekoppelt, wodurch diese im Bereich von 680 nm oder 800 nm Wellenlänge Photonen emittierten. Die Proteinbande

konnte über die fluoreszierenden Antikörper im Odyssey Image System (Li-Cor) visualisiert werden.

5.3 Immuno- und Enzymassays

5.3.1 p24 Antigen ELISA

Mit dem p24 Antigen ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) konnte quantitativ die Menge an HIV-1 Kapsid (p24) im Zellüberstand und damit die Viruspartikelproduktion bestimmt werden. Es handelt sich hierbei um ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf eine enzymatische Farbreaktion basiert.

Der erste spezifische Antikörper, α -CA 183 (*Coating* Antikörper), wurde in 100 μ l PBS pro well für 16 h auf einer 96-well Mikrotiterplatte immobilisiert. Danach wurde die Platte für 2 h mit 100 μ l 10% NKS/PBS pro well geblockt und ab diesem Zeitpunkt nach jedem Schritt dreimal mit PBS-T gewaschen. Für die p24 Antigenbindung wurden je 100 μ l Überstände (Verdünnungen) und rekombinanter p24 Proteinstandard (2 - 0,6 ng/ml) zur Quantifizierung aufgetragen und für 16 h bei RT inkubiert. Danach erfolgte nacheinander eine Inkubationsphase von 1 h bei 37°C mit dem Detektionsantikörper α -CA und mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper α -Kaninchen HRP jeweils in einem Volumen von 100 μ l 10 % NKS/PBS pro well. Nach dem letzten PBS-T Waschschrift wurden die Platten zusätzlich dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit 100 μ l PO-Substratpuffer (0,1M NaAc; TMB; 2 μ l H₂O₂) für 5 min entwickelt. Die Reaktion wurde mit 50 μ l 0,5 M H₂SO₄ pro well gestoppt. Im VERSAmax™ Mikroplattenleser (Molecular Devices) konnte anschließend die Extinktionsdifferenz von 560 – 450 nm bestimmt werden.

5.3.2 CAT ELISA

Im CAT ELISA (Roche) wurde quantitativ die Expression der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) von *E.coli* in transfizierten eukaryotischen Zellen bestimmt. Wie der p24 Antigen ELISA basierte auch dieser ELISA auf einem *Coating* Antikörper, einem Detektionsantikörper und auf die Farbreaktion über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Der Assay wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt und bei 490 – 405 nm im VERSAmax™ Mikroplattenleser (Molecular Devices) bestimmt.

5.3.3 SEAP Reporterassay

Zur internen Kontrolle wurde ein Expressionsplasmid für die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP; *secreted alkaline phosphatase*) in allen Transfektionsexperimenten, bei denen die Viruspartikelproduktion bestimmt werden sollte, kotransfiziert. SEAP wurde von einer Rev-unabhängigen gespleißten mRNA exprimiert. In den Überständen wurde die Aktivität und damit verbunden die Expressionsstärke der alkalischen Phosphatase mittels einer enzymatischen Farbreaktion bestimmt.

Hierfür wurden 200 µl des Zellkulturüberstandes für 10 min bei 65°C inkubiert und für 2 min bei 20000 x g zentrifugiert. Für den Assay wurden jeweils 100 µl des Überstandes mit 100 µl 2x SEAP Puffer in einer 96-well Mikrotiterplatte versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Es wurde 25 µl 120 nM Sigma-104 (Sigma Aldrich) in 1x SEAP Puffer hinzugegeben und der Farbumschlag wurde bei 405 nm im VERSAmax™ Mikroplattenleser (Molecular Devices) quantifiziert.

5.3.4 β-GAL Reporterassay

Das β-Galaktosidase Reporterkonstrukt (pβGal) diente in allen Transfektionsexperimenten mit CAT Reportern als interne Kontrolle. Die β-GAL Expression erfolgt von einer Rev-unabhängigen gespleißten mRNA.

Für den Assay wurden 20 µl des Zelllysats aus dem CAT ELISA Ansatz in 205 µl Z-Puffer auf 96-well Mikrotiterplatten eingesetzt. Zu jedem Ansatz wurden 20 µl CPRG (*Chlorophenolred-β-D-Galactopyranoside*) Lösung (1 mg/ml) als Substrat hinzugegeben. Der Farbumschlag bei 595 nm wurde im VERSAmax™ Mikroplattenleser (Molecular Devices) quantifiziert.

5.4 Bakteriologische Methoden

5.4.1 Kultivierung von Bakterien

E.coli Bakterienstämme wurden nach der Transformation auf LB Agarplatten mit 50 mg/ml Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) für 16 h bei 37°C kultiviert. Für Mini und Maxi Plasmidpräparationen wurden Bakterien in 5 ml bzw. 250 ml Flüssigkulturen für 16 h bei 180 rpm in LB Medium mit Antibiotikum bei 37°C geschüttelt. Für die Konservierung von Bakterienklonen wurde ein Aliquot Flüssigkulturen in 50% Glycerin bei 80°C eingefroren

5.5 Zellbiologische Methoden

5.5.1 Kultivierung von adhärennten Säugerzellen

Adhärennte HeLa, COS-7, NIH3T3 und 293T Zellen wurden in DMEM Medium bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre in Zellkulturflaschen kultiviert. Um die Zellen umzusetzen oder zu vereinzeln (*splitten*) wurde sie mit PBS gewaschen und danach für 4 min durch Zugabe einer Trypsin/EDTA Lösung (Biochrom) abgelöst. Die Zellen wurden verdünnt (1:4 - 1:10), in Zellkulturflaschen weiterkultiviert oder gezählt und für Transfektionsexperimente auf 6-*well* Zellkulturplatten oder 10 cm Platten ausgesät.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in 10% DMSO/FKS in Kryoboxen bei -80°C und später in flüssigem Stickstoff (-160°C) eingefroren. Das anschließende Auftauen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen, pelletiert (5 min bei 1200 rpm) und zur Kultivierung in Medium aufgenommen.

5.5.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die humane Zelllinie ACH-2 wurde in RPMI Medium bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage 1:5 gesplittet.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie adhärennte Zellen (5.5.1) eingefroren.

5.5.3 Transfektion von HeLa Zellen mit TurboFect oder TransIT

Für die transiente Expression von Proteinen und Reporterkonstrukten in Säugerzellen wurden 20 h vor der hierfür durchzuführenden Transfektion 2×10^5 HeLa, HLCD4-CAT oder HeLaTA Zellen pro *well* einer 6-*well* Platte, bzw. $1,2 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Schale für Fraktionierungsexperimente, in Medium ausgesät. Die Zellen wurden mit TurboFect® (Fermentas) oder TransIT® LT1 (Mirus) nach Herstellerangaben transfiziert. Standardmäßig erfolgte 5 h nach der Transfektion der Mediumwechsel in Medium mit Antibiotika (50 U/ml Penicillin; 50 µg/ml Streptomycin).

5.5.4 Transfektion von COS-7 Zellen mit DEAE Dextran

COS-7 Zellen wurden mit der DEAE Dextranmethode transfiziert. Hierfür wurden 20 h vor der Transfektion 3×10^5 Zellen pro *well* einer 6-*well* Platte in DMEM ausgesät. Der Transfektionscocktail wurde aus 0,5 mg/ml DEAE Dextran in PBS vorbereitet. Die Plasmidkonzentration im Cocktail betrug routinemäßig 2,5 µg/ml.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit dem Transfektionsansatz unter leichtem Schwenken kultiviert. Danach wurde die Zellen mit 2 ml FC Medium (DMEM/ 2% Fungizone/ 1 mM Chloroquine) für 2,5 h weiterkultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden für 2 min mit Schockmedium (DMEM/ 10% DMSO) behandelt. Es folgte ein Mediumwechsel durch DMEM mit Antibiotika (50 U/ml Penicillin; 50 µg/ml Streptomycin).

5.5.5 Herstellung von lentiviralen Partikeln

Für die Herstellung stabiler *Knockdown* Zellen wurde der lentivirale Mission[®] shRNA Vektor pLKO.1 verwendet (Abbildung 8). Der Vektor enthielt Sequenzen zur Expression genspezifischer shRNAs, eine Psi (ψ) Verpackungssequenz und flankierende lentivirale LTR Sequenzen für die Integration des Transgens. Das RSV 5'-LTR vermittelte die Transkription der transgenen RNA über den Promotor des Rous Sarcoma Virus. Das selbstinaktivierende SIN 3'-LTR mit einer Deletion in der U3 Region führte zur Ausschaltung der LTR-Transkriptionsaktivität nach der Integration der proviralen DNA in die Zielzelle. Die shRNA Expression wurde von einem internen U6 Promotor kontrolliert. Zusätzlich exprimierte der Vektor ein Puromycin- bzw. Blastocidin-Resistenzgen, welches zur Selektion der transduzierten Zellen genutzt wurde.

Die kodierenden Sequenzen für die lentiviralen Struktur- und Oberflächenproteine sowie Enzyme waren deletiert und wurden für die Partikelproduktion auf eigenständigen Expressionsvektoren *in trans* bereitgestellt. Hierzu dienten das Gag/Pol exprimierende Plasmid pDMLg/pRRE, pCMV-VSV-G zur Expression des heterologen Hüllproteins, dem Glykoprotein des Vesicular-Stomatits-Virus (VSV) und pRSV-Rev für die Transaktivierung der Gag/Pol Genexpression.

Zur Herstellung von lentiviralen Partikeln wurden 20 h vor der Transfektion 3×10^6 293T Zellen pro 10 cm Schale ausgesät. Standardmäßig wurden pro Transfektion 6 µg lentiviraler Vektor, 3 µg pDMLg/pRRE, 1,5 µg pCMV-VSV-G und 1,5 µg pRSV-Rev in 1,2 ml Opti-Mem Medium eingesetzt. Der Ansatz wurde mit 50 µl PEI (1 mg/ml) für 20 min bei RT inkubiert und anschließend ins Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Fünf h nach der Transfektion wurde das Medium durch DMEM mit Antibiotika (50 U/ml Penicillin; 50 µg/ml Streptomycin) gewechselt. Der Virusüberstand wurde 60 h nach der Transfektion geerntet und die Partikelkonzentration im p24 Antigen ELISA bestimmt.

Zellen zur Entfernung von freien Virionen dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden weiter in DMEM inkubiert und zur Kontrolle ein Aliquot des Überstandes zum Zeitpunkt $t = 0$ abgenommen.

In den Infektionsexperimenten mit HIV-1 NL4/3 Δ env wurde 48 h nach der Infektion die Virionenproduktion im p24 Antigen ELISA quantifiziert. Für die mehrtägigen Infektionsstudien mit Wildtyp HIV-1 wurden die Zellen gegebenenfalls verdünnt und die Partikelproduktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten im p24 Antigen ELISA bestimmt.

5.5.8 Transfektion mit dem Rev Reporter pDM128/RRE

Das pDM128/RRE Reporterkonstrukt enthielt die kodierende Sequenz für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT), deren Transkription durch einen CMV-IE Promotor kontrolliert wurde. Die CAT Sequenz wurde von einer HIV-1 5' Spleißdonorstelle und einer 3' Spleißakzeptorstelle flankiert. Zusätzlich enthielt das Konstrukt die Sequenz für das HIV-1 RRE. Die CAT Expression war abhängig von Rev, da die mRNA ohne Rev im Zellkern zurückgehalten und die CAT-kodierende Sequenz durch Spleißen entfernt wurde. Nur in Gegenwart von Rev kam es zum Kernexport der ungespleißten mRNA und zur CAT Expression.

In Transfektionsexperimenten wurden murine NIH3T3 Zellen in 6-well Zellkulturplatten mit jeweils 500 ng Reporter, 250 ng Rev Expressionskonstrukten und 125 ng p β GAL (interne Kontrolle) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die CAT Expression in den transfizierten Zellen im CAT ELISA untersucht und die β -Gal Expression im speziellen Enzymassay bestimmt.

5.5.9 Transfektion mit dem GPV-RRE Reporter

Das GPV Reporterkonstrukt enthielt das HIV-1 *gag-pol* und *vif* Gen sowie die RRE Sequenz. Wie beim Provirus wurde Gag von einer ungespleißten RNA exprimiert, womit die Gag Expression abhängig von Rev war. Das Gag Vorläuferprotein p55 wurde prozessiert und es kam zur Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln (VLP: *Virus-Like-Particles*).

In den Transfektionsexperimenten wurden HeLa oder COS-7 Zellen in 6-well Zellkulturplatten mit jeweils 500 ng pGPV-RRE, 250 ng Rev Konstrukten und 125 pSEAP transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Menge an VLP im Überstand im p24 Antigen ELISA bestimmt und die Gag Expression und Prozessierung im Western Blot untersucht. Die SEAP Aktivität im Überstand wurde im speziellen Enzymassay quantifiziert.

5.5.10 *Virus Rescue Assay* mit pHXB2ΔBam

Zur Untersuchung der Rev Aktivität im proviralen Kontext wurden Transfektionsexperimente mit dem Expressionsplasmid pHXB2ΔBam durchgeführt. Das Expressionsplasmid enthielt die komplette provirale Sequenz des HIV-1 Isolats HXB2 mit einer Deletion in der Rev-kodierenden Sequenz. Nur durch die transiente Kotransfektion von Rev *in trans* wurde der Kernexport der viralen Rev-abhängigen mRNA vermittelt. Dadurch kam es zur Gag Expression und zur Produktion von Virionen.

Für die Expressionsexperimente wurden HeLa Zellen in 6-*well* Zellkulturplatten mit 500 ng pHXB2ΔBam, 250 ng Rev Expressionskonstrukt und 125 ng pSEAP transfiziert. 60 h nach der Transfektion wurde die Partikelproduktion im p24 Antigen ELISA analysiert und/oder die Gag Expression im Western Blot bestimmt.

Für die Untersuchung des Exports der viralen mRNA wurden 10 cm Schalen mit 3 µg pHXB2ΔBam, 1,5 µg Rev und 750 ng SEAP transfiziert. 70 h nach der Transfektion wurden die Überstände im p24 Antigen ELISA analysiert, die Zellen subzellulär fraktioniert und die RNA isoliert.

5.5.11 *In vivo* RRE Bindungsassay mit dem SLIIB/CAT Reporter

Zur Bestimmung der RRE Bindungsfähigkeit von Rev Mutanten wurden *in vivo* Bindungsstudien mit dem SLIIB/CAT Reporter durchgeführt. Der Reporter enthielt die kodierende Sequenz der Chloramphenicol-Acetyl Transferase (CAT), welche von einer gespleißten mRNA exprimiert wurde. Die Kontrolle der Transkription unterlag einer modifizierten HIV-1 5'-LTR Promotorsequenz mit einer Substitution innerhalb der TAR (*Tat Activation Region*) Sequenz. Hierbei wurde die *Stem-Loop* Erkennungssequenz für Tat durch die primäre Zielsequenz für Rev, dem RRE-SLIIB, ausgetauscht. Im Assay wurden Bindungsstudien mit Tat/Rev Fusionsproteinen durchgeführt. Durch die Bindung von Rev an die SLIIB Sequenz wurde über den Tat Fusionsanteil die Transaktivierung des Promotors vermittelt und die CAT Expression eingeleitet.

Zur Analyse wurden HeLa Zellen in 6-*well* Zellkulturplatten mit jeweils 500 ng pSLIIB/CAT, 250 ng Tat/Rev Konstrukt und 125 ng pβGAL (interne Kontrolle) transfiziert. Die Transaktivierung wurde im CAT ELISA 48 h nach der Transfektion analysiert und die β-Gal Expression im Enzymassay bestimmt.

5.5.12 FACS-basierte FRET Analyse

Für die Darstellung der Interaktion zwischen den verschiedenen Rev Mutanten *in vivo* wurde die Methode des Förster Resonanz Energietransfer (FRET) genutzt. Die Interaktionsstudien basieren auf dem Energietransfer von einem Donorfluorophor (CFP) auf ein Akzeptorfluorophor (YFP). Unter Anregung des Donors kommt es hierbei zu einer erhöhten Emission des Akzeptors. Der Energietransfer erfolgte nur dann, wenn die räumliche Entfernung zwischen Donor und Akzeptor geringer als 10 nm war. Für die FRET Analyse wurden Rev-CFP und Rev-YFP Fusionsproteine im FACS untersucht.

COS-7 Zellen wurde in 6-well Zellkulturplatten mit jeweils 500 ng GPV-RRE, 250 ng Rev-CFP und Rev-YFP transfiziert. Nach 48 h wurden die Überstände im p24 Antigen ELISA hinsichtlich der Partikelproduktion untersucht, die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und in FACS Puffer für die Messung aufgenommen. Die FACS FRET Messungen wurde im FACS Canto II (BD Bioscience) durchgeführt. Für die Messung der CFP- und FRET Signale wurden Zellen mit einem 405 nm Laser angeregt. Das CFP Fluoreszenzsignal wurde mit einem 450/40 nm Filter und das FRET Signal mit einem 529/24 Filter detektiert (Semrock). YFP wurde mit einem 488 nm Laser angeregt und mit einem 529/24 nm Filter detektiert. Mindestens 1000 CFP/YFP positive Zellen wurde pro Interaktionsanalyse untersucht.

5.5.13 RNA Stabilitätsstudien

Die Stabilität der viralen *gag* RNA wurde mit der *Transcriptional Pulse* Strategie (Loflin *et al.*, 1999) und dem Reporter pUHC-HXB2ΔBam untersucht. Der Reporter besaß einen CMV-IE/tetO7 Promotor, der durch einen Tetracyclin-sensitiven Transaktivator kontrolliert wurde. In HeLa_{tTA} Zellen kam es durch die konstitutive Expression des Fusionsproteins tTA, bestehend aus einer Tet Bindedomäne und dem Aktivator VP16 von HSV, zur Transkription von *gag* mRNA. In Gegenwart von Tetracyclin oder Doxycyclin wurde die Bindung des tTA Transaktivators unterbunden und damit die mRNA Neusynthese gestoppt.

Pro Ansatz wurden $1,5 \times 10^6$ HeLa_{tTA} mit 3 µg pUHC-HXB2ΔBam, 1,5 µg Rev Konstrukt und 750 ng pSEAP transfiziert. 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf 35 mm Platten mit 100 ng/ml Doxycyclin ausgesät. Nach 16 h Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 4 h in Doxycyclin-freiem Medium kultiviert. Während dieser Zeit erfolgte der *Transcriptional Pulse*. Die mRNA Synthese wurde mit 1 µg/ml Doxycyclin gestoppt und ab diesen Zeitraum ($t = 0$) wurden die Gesamt-RNAs zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert.

5.5.14 Heterokaryonstudien

Das Rev *Shuttling* zwischen Zellkern und Zytoplasma wurde in Heterokaryonstudien untersucht. Da Rev im Gleichgewichtszustand im Kern und vorzugsweise in den Nukleoli lokalisiert, wurden Rev-exprimierende humane Zellen mit Rev-negativen murinen Zellen fusioniert. Durch den stattfindenden Kernexport und Kernimport kam es in den Zellhybriden zu einer Verteilung des Proteins in den humanen und murinen Zellkernen.

Für die Heterokaryonexperimente wurden HeLa Zellen mit 500 ng Rev Konstrukt transfiziert und für 24 h inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst und gezählt. Es wurden jeweils $0,5 \times 10^5$ HeLa und 1×10^5 NIH3T3 auf Mikroskopierdeckgläschen in 12-well Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h wurde die Translation mit 100 ng/ml Cycloheximid gestoppt und der CRM1-abhängige Export mit 20 nM LMB inhibiert. Die Zellen wurden für weitere 3 h inkubiert und es folgte die Fusion der Zellen mit PEG1500 (Roche). Hierfür wurden die Mikroskopierdeckgläschen für 2 min in einem Tropfen PEG1500 inkubiert und anschließend dreimal sehr vorsichtig mit PBS gewaschen. Die fusionierten Zellen wurden für 1 h in Cycloheximid-haltigem Medium mit oder ohne 20 nM LMB inkubiert. Danach erfolgten die Fixierung mit 3% PFA/PBS und die Visualisierung der Rev Lokalisation in der indirekten Fluoreszenzmikroskopie.

5.6 Mikroskopische Methoden

5.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz für Rev Lokalisationsstudien

Für die Rev Lokalisationsstudien im Heterokaryonassay wurden die auf Mikroskopierdeckgläschen fixierten Hybridzellen mit Antikörpern gefärbt. Zuerst wurden die überschüssigen reaktiven Gruppen des PFAs durch Inkubation mit 100 mM Glycin/PBS für 10 min geblockt. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,1% Triton/PBS für 4 min. Die fixierten Zellen wurden mit 1% BSA/PBS geblockt und für 30 min mit dem α -Rev Antikörper in 1% BSA/PBS inkubiert. Im zweiten Schritt erfolgte die Behandlung mit einem α -Maus-Cy3 Antikörper. Zwischen allen Schritten wurden die fixierten Zellen jeweils dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Zur Einfärbung der Kerne wurden die Zellen mit 50 ng/ml Hoechst 33258 für 10 min behandelt, anschließend einmal mit PBS gewaschen und mit Mowiol (Calbiochem) eingebettet. Die Lokalisation von Rev wurde im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 2000/Zeiss) detektiert.

6 Ergebnisse

6.1 Die Rolle der Multimerisierung bei der Rev Transaktivierung

6.1.1 Rev Mutanten für Multimerisierungsstudien

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Multimerisierung von Rev hinsichtlich der Rev Transaktivierung von HIV-1 analysiert. Für die nachfolgenden Studien wurden verschiedene Rev Mutanten verwendet, die in Abbildung 9 schematisch dargestellt sind. Bei den Rev Expressionskonstrukten handelte es sich um das Wildtyp Protein (RevWT) und um die Mutanten RevSLT40, ZipRevSLT40 und RevM10.

Das RevWT Expressionskonstrukt wurde durch die Einführung der beiden Exons des viralen HIV-1 Isolats HXB3 in den pBC12 Expressionsvektor (Cullen, 1986) generiert und diente als Ausgangsvektor für die Konstruktion der weiteren Mutanten.

Bei der RevSLT40-Mutante wurden die Aminosäuren Isoleuzin (I) und Leuzin (L) an den Positionen 59 und 60 innerhalb der Multimerisierungsdomänen II (MII) durch zwei Asparaginsäurereste (DD) ausgetauscht. *In vitro* RNA Retardations- (*mobility shift*) Analysen zeigten, dass diese Mutante als Monomer an das virale RRE binden kann, aber im Gegensatz zu RevWT nicht in der Lage war, höhere Komplexe zu bilden. Auch *in vivo* Bindungs- und kombinierte Bindungs-/Multimerisierungsanalysen verdeutlichten, dass eine Bindung an die primäre Bindungsstelle (SLIIB) im RRE stattfand, es danach aber nicht zur Interaktion mit weiteren Rev Molekülen kam. Die Multimerisierungs-defiziente Mutante RevSLT40 war biologisch inaktiv und wies einen transdominanten Phänotyp auf (Thomas *et al.*, 1998).

Die ZipRevSLT40 Mutante trug ein heterologes Leuzin Zipper Dimerisierungsmotiv (NH₂-MDPKLQRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGG-COOH). Der Leuzin Zipper stammte vom Transkriptionsfaktor GCN4 der Hefe und wurde aminoterminal an die RevSLT40 Sequenz fusioniert. Kristallstrukturdaten belegten, dass der GCN4 Leuzin Zipper ein Dimer bildet (Oshea *et al.*, 1991). Durch die Fusion dieses Motivs an RevSLT40 sollte künstlich die Dimerisierung von Rev Monomeren induziert werden. In früheren Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die biologische Funktion von RevSLT40 durch die Induktion der Dimerisierung teilweise wiederhergestellt wurde (J. Hauber, persönliche Mitteilung).

Bei RevM10 wurde ein Leuzin (L) an Position 78 durch ein Asparagin und eine Glutaminsäure (E) durch ein Leuzin an Position 79 ausgetauscht. Die Mutation befand sich in der Aktivierungsdomäne innerhalb des Kernexportsignals (NES). Hierdurch fand kein Kernexport der Mutante durch den Exportrezeptor CRM1 statt. Dadurch war diese Mutante

biologisch inaktiv und diente als Negativkontrolle. RevM10 besitzt einen transdominanten Phänotyp, der deutlich ausgeprägter ist als die Transdominanz von RevSLT40 (Malim *et al.*, 1989a; Thomas *et al.*, 1998).

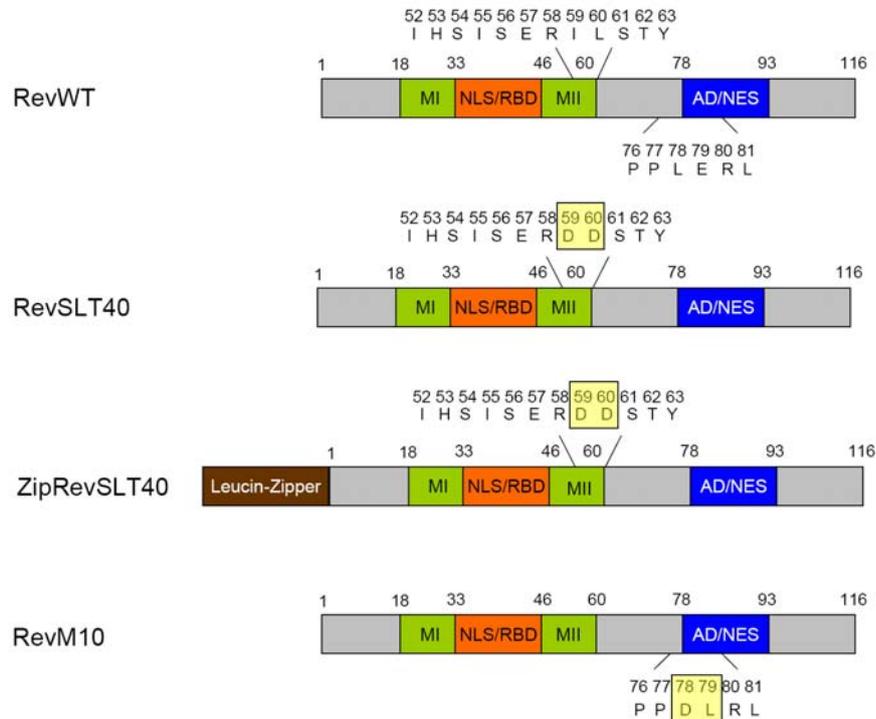


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Rev Mutanten: Die RNA Bindungsdomäne (RBD) und das NLS werden von Sequenzen (MI und MII) flankiert, die in der Sekundärstruktur eine hydrophobe Dimerisierungsoberfläche bilden. Die Aktivierungsdomäne und das NES sind carboxyterminal lokalisiert. RevSLT40 ist eine Multimerisierungs-defiziente Mutante (I59D/L60D). ZipRevSLT40 besitzt eine heterologes Leucin Zipper Motiv am N-Terminus. Die *Shuttling*-defiziente Mutante RevM10 diente als Negativkontrolle. WT, Wildtyp.

6.1.2 Biologische Aktivität der Mutanten im *Virus Rescue Assay* (HXB2ΔBam).

In verschiedenen vorherigen Rev Reporterassays wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass durch die Fusion des Zipper Motivs an die ansonsten biologisch inaktive Mutante RevSLT40 deren Funktion teilweise wiederhergestellt wurde. In *Virus Rescue Assays* mit HXB2ΔBam, welche die Rev-abhängige Freisetzung von Viruspartikeln messen, kam es in Gegenwart von RevSLT40 Monomeren zur Hemmung der Virusfreisetzung und der zytoplasmatischen Akkumulation von ungespleißter Rev-regulierter *gag* RNA. Durch die Expression von ZipRevSLT40 konnten hingegen hohe Mengen von *gag* RNA im Zytoplasma detektiert werden.

Nun sollte der Einfluss der verschiedenen Rev Mutanten auf die Verteilung der viralen RNA detaillierter untersucht werden. Erstmals wurde der Einfluss der Rev Multimerisierung auf die Verteilung aller drei Klassen von viralen RNAs analysiert. Durch quantitative *Realtime* RT-PCR konnte zwischen *gag*, *env* und *tat* RNA unterschieden werden.

Hierfür wurden HeLa Zellen mit dem proviralen Konstrukt HXB2 Δ Bam und den Konstrukten für die verschiedenen Rev Mutanten transfiziert. Als interne Transfektionskontrolle diente die sekretierte alkalische Phosphatase SEAP.

Die Rev Transaktivierung wurde als Viruspartikelproduktion dargestellt. Hierfür wurde die Menge an Kapsidprotein im Zellüberstand im p24 Antigen ELISA bestimmt. Die absoluten p24 Mengen wurden an die SEAP Aktivität angepasst, die einen Aufschluss über die Transfektionseffizienz gibt. Um die Expression der verschiedenen Rev Expressionskonstrukte zu vergleichen, wurden Zellpellets geerntet und die Rev Expression mittels Western Blot Analyse mit Rev-spezifischen Antikörpern untersucht.

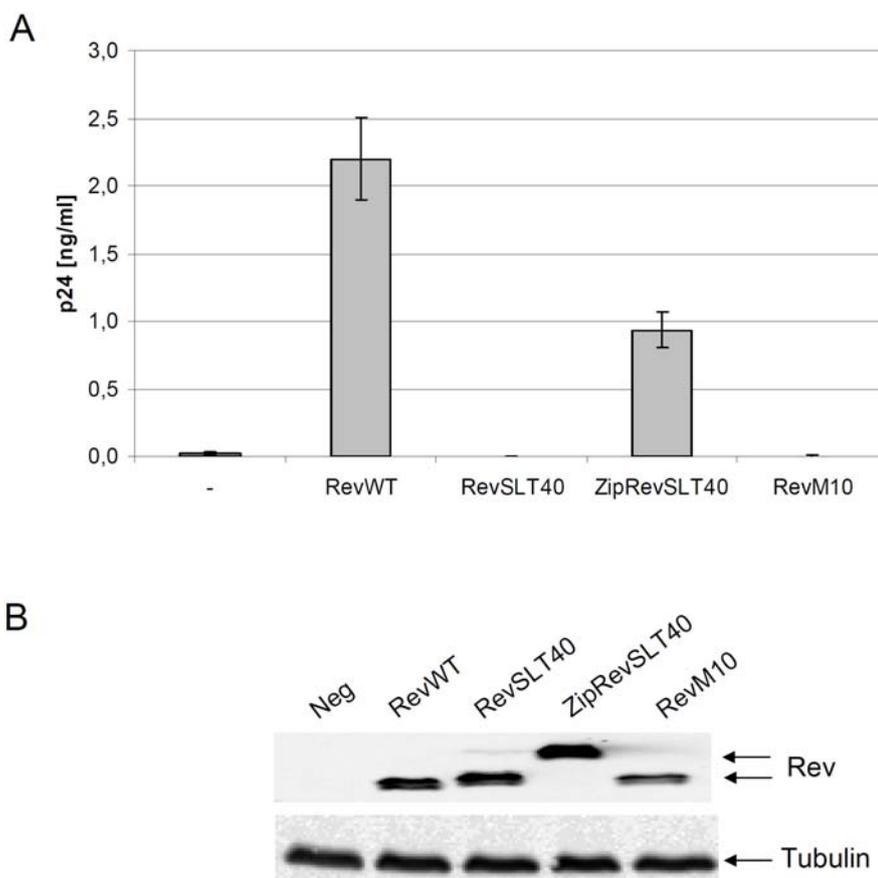


Abbildung 10: Biologische Aktivität der Rev Mutanten im *Virus Rescue Assay*. HeLa Zellen wurde transient mit HXB2 Δ Bam und den verschiedenen Rev Konstrukten kotransfiziert. Die Viruspartikelmenge im Überstand wurde im p24 Antigen ELISA bestimmt. Die Werte wurden an die SEAP Expression als interne Kontrolle angepasst. (B) Expressionsnachweis der Rev Konstrukte in diesem Experiment mittels Western Blot Analyse.

Für die Untersuchung des RNA Transports wurden die zuvor transfizierten Zellen in zytoplasmatische und nukleäre Kompartimente fraktioniert und die RNA isoliert. Danach wurden die absoluten Kopien an virale mRNA in den unterschiedlichen Fraktionen mittels *Realtime* RT-PCR bestimmt. Zur Darstellung wurden die mRNA Kopien an die endogenen GAPDH mRNA Mengen angepasst. Die Reinheit der zytoplasmatischen Fraktion wurde mit Hilfe eines *Slot* Blot und einer spezifischen ^{32}P -markierten U6-Sonde kontrolliert. Diese wurde gewählt, da U6 snRNA ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Hamm and Mattaj, 1989). Die gemessenen Viruspartikel im Zellüberstand zeigten, dass die biologische Aktivität durch die Dimerisierung von ZipRevSLT40 im Vergleich zu RevWT teilweise wiederhergestellt wird (Abbildung 10 A). Hierbei lag die biologische Aktivität der ZipRevSLT40 Dimerisierungsmutante, wie auch in vorherigen Experimenten unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde, zwischen 40 – 60% im Vergleich zum Rev Wildtypprotein. Die biologisch inaktiven RevSLT40 und RevM10 zeigten im *Virus Rescue Assay* dagegen keine Transaktivierung. Der dazugehörige Western Blot demonstrierte eine vergleichbare Expressionsstärke der verschiedenen Rev Konstrukte (Abbildung 10 B).

Die Quantifizierung der viralen RNA im Zellkern und Zytoplasma zeigten deutlich, dass es durch RevSLT40 zu keiner Rev-vermittelten Anreicherung von *gag* RNA im Zytoplasma kam (Abbildung 11 A). Stattdessen akkumulierten hohe Mengen an ungespleißter RNA im Zellkern. Durch die induzierte Rev Dimerisierung wurde eine ähnliche Verteilung der *gag* RNA wie bei RevWT beobachtet und somit der Rev-vermittelte *gag* RNA Kernexport rekonstituiert. RevM10 verhinderte den Export der ungespleißten RNA. Vergleichbare Daten lieferten die Untersuchung des zytoplasmatischen Transport der einfach-gespleißten *env* RNA, die ebenfalls Rev-abhängig transportiert wurde (Abbildung 11 B). Die virale *env* RNA akkumulierte im Zytoplasma in Gegenwart von RevWT und der Mutante ZipRevSLT40. RevSLT40 und RevM10 waren nicht in der Lage, diesen Export zu vermitteln.

Der Transport von vollständig gespleißter RNA fand, wie in der Literatur beschrieben (Felber *et al.*, 1989; Malim *et al.*, 1989b), unabhängig von Rev statt. Die Mutanten hatten keinen Einfluss auf die nukleozytoplasmatische Verteilung der viralen *tat* Transkripte (Abbildung 11 C).

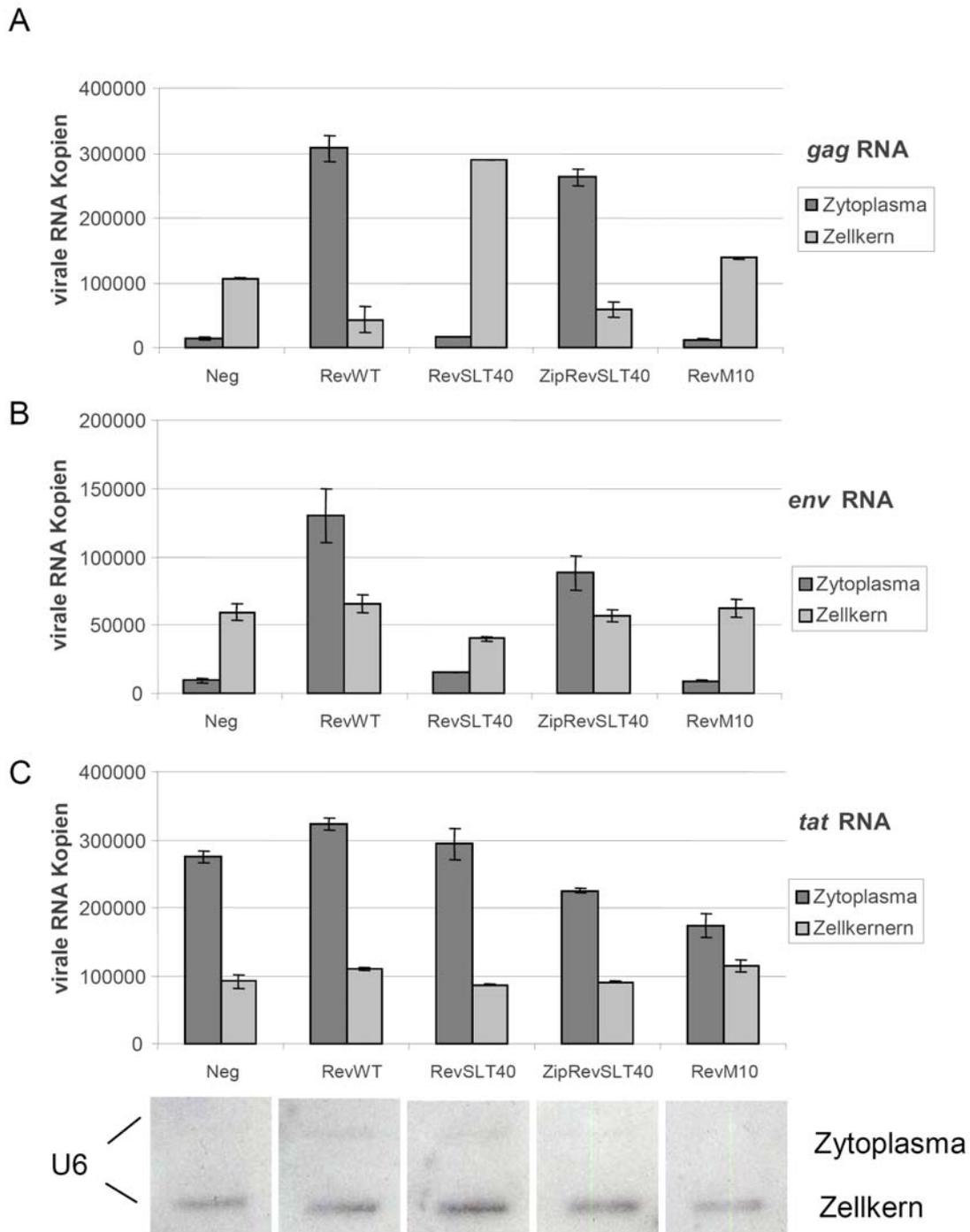


Abbildung 11: Einfluss der Rev Mutanten auf die zelluläre Verteilung der viralen mRNA Klassen. Transiente Transfektion von HeLa Zellen mit HXB2 Δ Bam und verschiedenen Rev Konstrukten. Subzelluläre Fraktionierung und Isolierung der Gesamt-RNA. Quantifizierung der (A) ungespleißten *gag*, (B) einfach-gespleißten *env* und (C) komplett-gespleißten *tat* RNA im Kern und im Zytoplasma mittels *Realtime* RT-PCR. Anpassung der Werte an die endogene GAPDH mRNA Menge. (D) Fraktionierungskontrolle mit einer radioaktiven U6-Sonde, die ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Hamm *et al.*, 1989).

6.1.3 Darstellung der Rev Komplexbildung mit Hilfe einer FACS-basierten FRET Analyse

Die Fähigkeit der verschiedenen Rev Mutanten zur Komplexbildung wurde mit Hilfe einer FACS-basierten FRET Analyse in lebenden Zellen untersucht. Hierfür wurden die verschiedenen Rev Mutanten in pECFP-N1 (*Cyan Fluorescence Protein*) und pEYFP-N1 (*Yellow Fluorescence Protein*) Expressionsvektoren ligiert.

In Vorexperimenten wurden die biologische Aktivität und die Expression der verschiedenen Rev-CFP/-YFP Expressionskonstrukte analysiert. Hierfür wurden COS-7 Zellen mit dem Rev Reporter pGPV-RRE (Kotsopoulou *et al.*, 2000) und den einzelnen Rev Konstrukten transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Expression der verschiedenen Rev Mutanten und die Gag Expression durch Western Blot Analyse bestimmt (Abbildung 12). Es konnte gezeigt werden, dass alle Mutanten in vergleichbaren Mengen in den Zellen exprimiert wurden und die RevWT sowie die ZipRevSLT40 Fusionsproteine biologisch aktiv waren, wobei es zur Expression von Gag p55 und p24 kam.

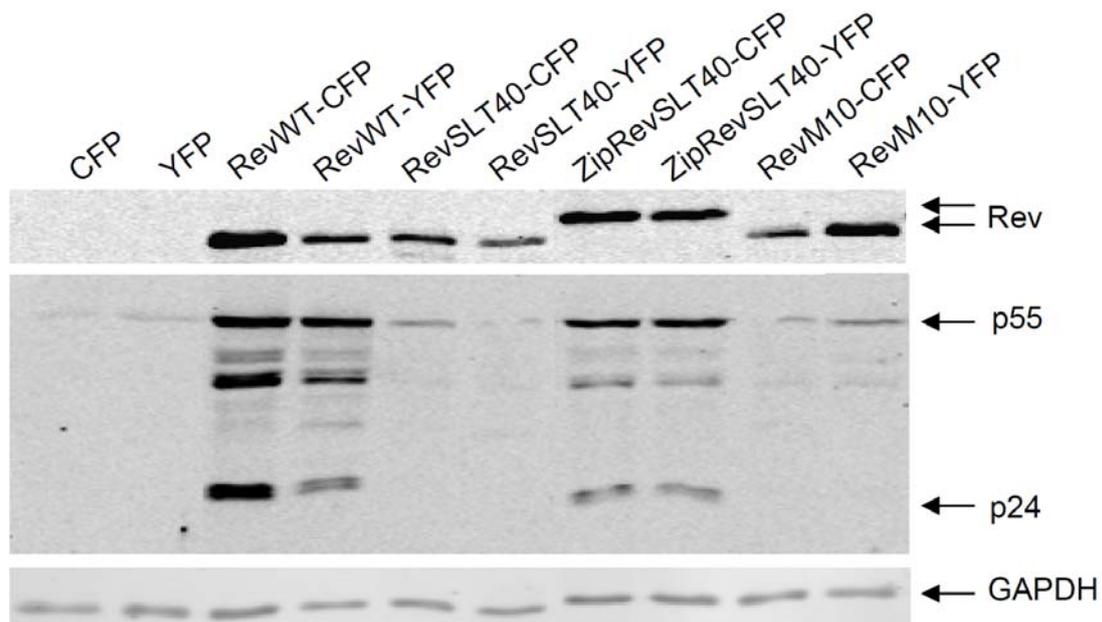


Abbildung 12: Expressionsnachweis der Rev Fusionsproteine und der Gag Expression durch Rev Transaktivierung. Transiente Transfektion von COS-7 Zellen mit GPV-RRE und Rev-CFP/-YFP Fusionsproteine. Nachweise der Rev und Gag Expression im Western Blot. GAPDH als Ladekontrolle.

Für die FACS-FRET Analyse wurden COS-7 Zellen mit verschiedenen Kombinationen von Rev-CFP und Rev-YFP Expressionsplasmiden transfiziert. Da in vorherige Studien beschrieben wurde, dass die Multimerisierung von Rev verstärkt nach der Bindung eines Monomers an das RRE stattfindet (Malim *et al.*, 1991), wurden der Rev-abhängige Reporter

pGPV-RRE kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die Analyse geerntet. Die FRET-positiven Zellen wurden im FACS analysiert (Abbildung 13).

Die FACS Messung ergab, dass RevWT in hohem Maß Komplexe bildete. 80,3% der Zellen waren FRET-positiv. Nur 2,8% der mit RevSLT40 Konstrukte transfizierten Zellen zeigten ein FRET Signal. Dies bestätigte vorherige *in vivo* und *in vitro* Studien, die zeigen konnten, dass die Mutante als Monomer vorliegt und keine höheren Komplexe ausbilden kann (Thomas *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft wurde bei der ZipRevSLT40 Mutanten wiederhergestellt. Im FACS zeigten 41,9 % der Zellen ein FRET Signal. Dies belegte, dass über das heterologe Zipper Motiv eine Wechselwirkung stattfand und es vermutlich zur Dimerisierung kam. Die Komplexbildung von RevM10 ist mit 26,5% FRET-positiver Zellen deutlich geringer als bei RevWT, fand jedoch statt.

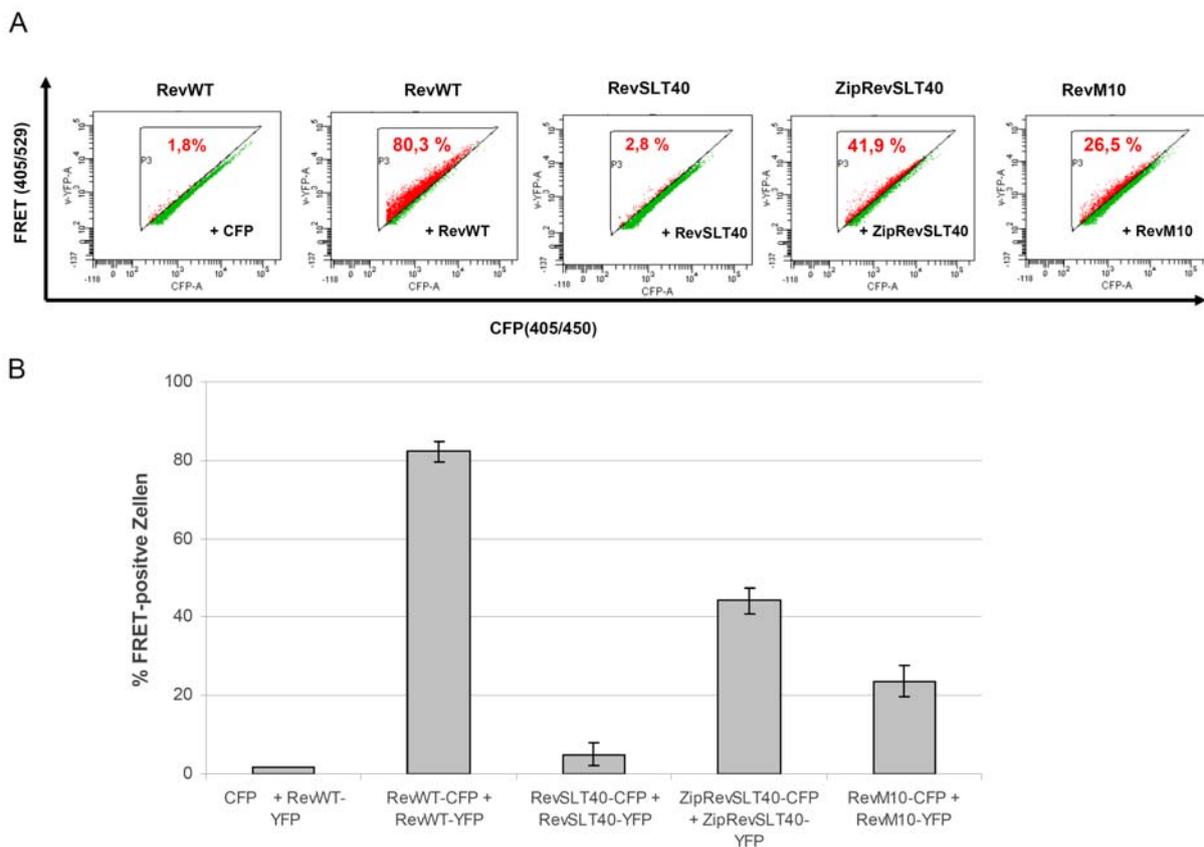


Abbildung 13: Nachweis von Rev-Rev Interaktionen in FACS-basierten FRET Studien. COS-7 Zellen wurden mit GPV-RRE und verschiedenen Rev Fusionsmutanten transient transfiziert. Die CFP und YFP doppelt-positiven Zellen wurden im FACS auf FRET untersucht. (A) Repräsentativer FACS-Blot der FRET-positiven Zellen. (B) Mittelwerte und Standardabweichung an FRET-positiven Zellen aus zwei unterschiedlichen Experimenten.

6.1.4 Einfluss der Rev Multimerisierung auf die Stabilität der ungespleißten RNA

Frühere Studien haben gezeigt, dass Rev die Stabilität der ungespleißten *gag* Transkripte beeinflusst (Felber *et al.*, 1989). Nun sollte untersucht werden, ob die Multimerisierung einen Einfluss auf diese Rev Funktion ausübte.

Es wurde dazu ein *Transcriptional Pulsing* Ansatz verwendet, mit welchem man den Effekt der verschiedenen Rev Mutanten auf die Halbwertszeit von *gag* RNA analysieren konnte. Die komplette provirale DNA Sequenz von HIV-1 HXB2 Δ Bam wurde ohne 5'-LTR in den Expressionsvektor pUHC ligiert (Abbildung 14 A). Es handelte sich hierbei um ein Tetracyclin-sensitives Transaktivator-kontrolliertes Promotorsystem, das es ermöglichte, die Transkription der zu untersuchenden mRNA durch Tetracyclin oder Tetracyclin Derivate (z.B. Doxycyclin) zu inhibieren. In stabilen HeLatTA Zellen, die den Transaktivator tTA exprimieren, wurde die *gag* Transkription über das pUHC-HXB2 Δ Bam Konstrukt konstitutiv aktiviert, konnte aber durch die Zugabe von Doxycyclin inhibiert werden.

Zur Applikationsanalyse wurden HeLatTA Zellen mit pUHC-HXB2 Δ Bam und einen RevWT Expressionsvektor oder dem parentalen pBC12 Leervektor transfiziert. Nach 5 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 100 ng Doxycyclin über Nacht kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde mit TriFAST (Pqlab) isoliert und die Expressionsniveaus von *gag*, *env* und *tat* RNA mittels *Realtime* RT-PCR quantifiziert (Abbildung 14 B). Alle drei Klassen an viraler RNA wurden exprimiert. In Gegenwart von Rev wurde mehr ungespleißte RNA und weniger einfach- und vollständig-gespleißte RNA im Vergleich zur Leervektorkontrolle detektiert. Durch die Behandlung der Zellen mit Doxycyclin wurde die Expression aller HIV-1 Transkripte auf 6 - 7% der Kopienzahl ohne Doxycyclin gesenkt.

Zusätzlich sollte die biologische Aktivität der Rev Mutanten mit dem pUHC-HXB2 Δ Bam getestet werden. HeLatTA Zellen wurden mit pUHC-HXB2 Δ Bam, pSEAP als interne Transfektionskontrolle und den verschiedenen Rev Konstrukten transfiziert. Danach wurden einige Zellen mit Doxycyclin (100 ng/ml) behandelt. 36 h nach der Transfektion wurde die Partikelproduktion im Zellüberstand im p24 Antigen ELISA quantifiziert (Abbildung 14 C). Die Werte wurden an die SEAP Expression angepasst. Die Rev Mutanten zeigten einen vergleichbaren Phänotyp wie im *Virus Rescue Assay* mit pHXB2 Δ Bam (Abbildung 10). Durch die Behandlung mit Doxycyclin wurde die Partikelproduktion nahezu vollständig gehemmt.

Das pUHC-HXB2 Δ Bam Konstrukt besaß somit die Voraussetzungen, für *Transcriptional Pulsing* Experimente zur Bestimmung der Halbwertszeit der ungespleißten HIV-1 *gag* RNA verwendet zu werden. Es wurden HeLatTA Zellen mit pUHC-HXB2 und den verschiedenen Rev Mutanten transfiziert. Nach dem *Transcriptional Pulse* wurde die Transkription durch Doxycyclin gehemmt und ab diesen Zeitpunkt ($t = 0$) wurde der Abbau der RNA

dokumentiert. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 1, 2, 4, 6, 10, 16, 20, 24 h) nach Transkriptionsstopp die gesamte RNA mit TriFAST isoliert und die *gag* RNA mittels *Realtime* RT-PCR quantifiziert. Die *gag* RNA Kopien wurden an die endogenen GAPDH mRNA Menge angepasst.

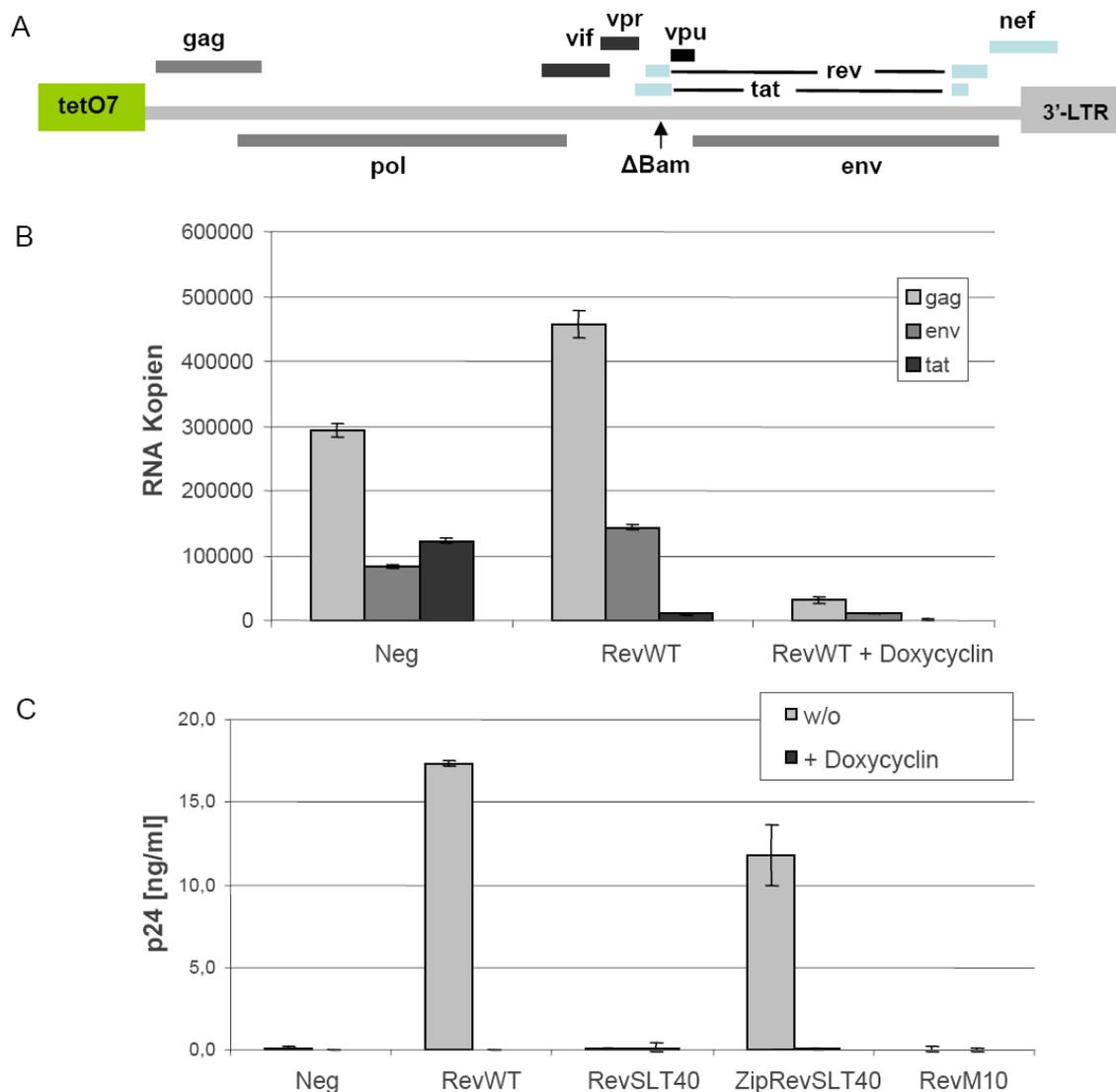


Abbildung 14: Applikation eines proviralen Reporters für *transcriptional pulsing* Experimente. (A) Schematische Darstellung des Rev Reportervirus. Austausch der HIV-1 5'-LTR Promotorregion gegen einen Tetracyclin-regulierten tetO7 Promotor. (B) Transiente Transfektion von HeLaTA Zellen mit pUHC-HXB2ΔBam und pRevWT oder den parentalen pBC12 Leervektor. Inhibition der Transkription aller viraler mRNA Klassen durch Doxycyclin (100 ng/ml). Nachweis über *Realtime* RT-PCR. (C) Untersuchung der biologischen Aktivität der Rev Mutanten in Transfektionsexperimenten mit pUHC-HXB2ΔBam und Inhibition der Partikelproduktion durch Doxycyclin. Quantifizierung im p24 Antigen ELISA.

Der virale mRNA Abbau wurde mathematisch und graphisch mit Excel (Microsoft) ausgewertet (Abbildung 15). Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde die *gag* Kopienzahl in jedem Ansatz mit dem Wert = 1 gleichgesetzt. Die Menge an *gag* mRNA zu den anderen Zeitpunkten

wurde relativ zum Ausgangswert dargestellt. Es wurde eine exponentielle Regressionsgerade ($y = e^{-x}$) durch alle Werte gelegt. Mit Hilfe dieser Funktion konnte über die Gleichung $T_{1/2} = \ln(2)/x$ die Halbwertszeit bestimmt werden. Die Halbwertszeit der ungespleißten RNA war in Gegenwart der verschiedenen Rev Mutanten nicht signifikant unterschiedlich. Somit konnte ein Einfluss der Rev Multimerisierung auf die RNA Stabilität ausgeschlossen werden.

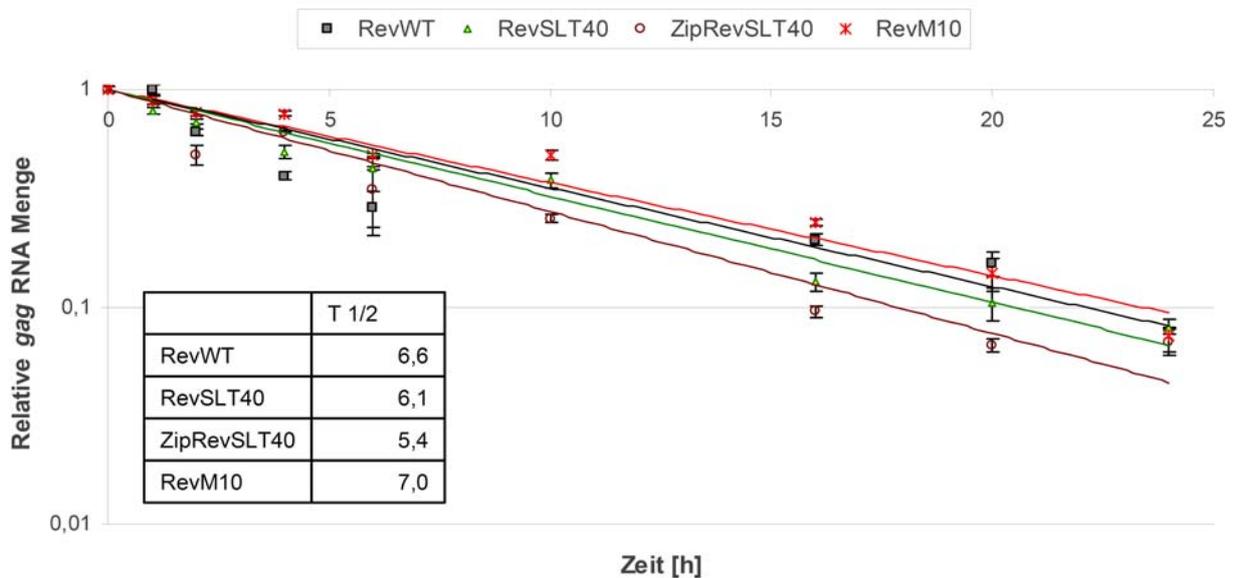


Abbildung 15: Stabilität der *gag* mRNA in Gegenwart der Rev Mutanten. Transiente Transfektion von HeLaTA Zellen mit pUHC-HXB2ΔBam und verschiedenen Rev Konstrukten. *Transcriptional Pulse* und Quantifizierung der Menge an *gag* RNA zu verschiedenen Zeitpunkten mittels *Realtime* RT-PCR. Bestimmung der Halbwertszeiten über die exponentielle Regressionskurve.

6.1.5 Einfluss der CRM1-Rev Interaktion auf die ZipRevSLT40 Transaktivierung

Die induzierte Rev Dimerisierung bei der ZipRevSLT40 Mutante führte zur deutlichen Rekonstitution der biologischen Aktivität. Nun sollte analysiert werden, ob die ZipRevSLT40 Transaktivierung ebenso wie beim RevWT vom CRM1 Kernexportweg abhängig war und nicht alternative Exportwege durch das Fusionsprotein genutzt wurden. Hierfür wurde der CRM1 Export mit Leptomycin B (LMB), einem hochspezifischen CRM1 Inhibitor (Wolff *et al.*, 1996), gehemmt.

HeLa Zellen wurden dazu mit HXB2ΔBam und den verschiedenen Mutanten transfiziert und 24 h in Medium mit oder ohne LMB (10 ng/ml) kultiviert. Die p55 und p24 Gag Expression wurde im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 16).

Bei RevWT sowie bei ZipRevSLT40 wurde die Gag Expression signifikant durch LMB Zugabe gehemmt. Daraus wurde ersichtlich, dass die ZipSLT40 Transaktivierung wie beim Rev Wildtyp über die spezifisch Interaktion mit dem CRM1 Kernexportrezeptor stattfindet.

Bedingt durch die Überexpression des proviralen Reporters kam es auch in Gegenwart der biologisch-inaktiven Mutanten RevSLT40 und RevM10 zur residualen Gag Expression.

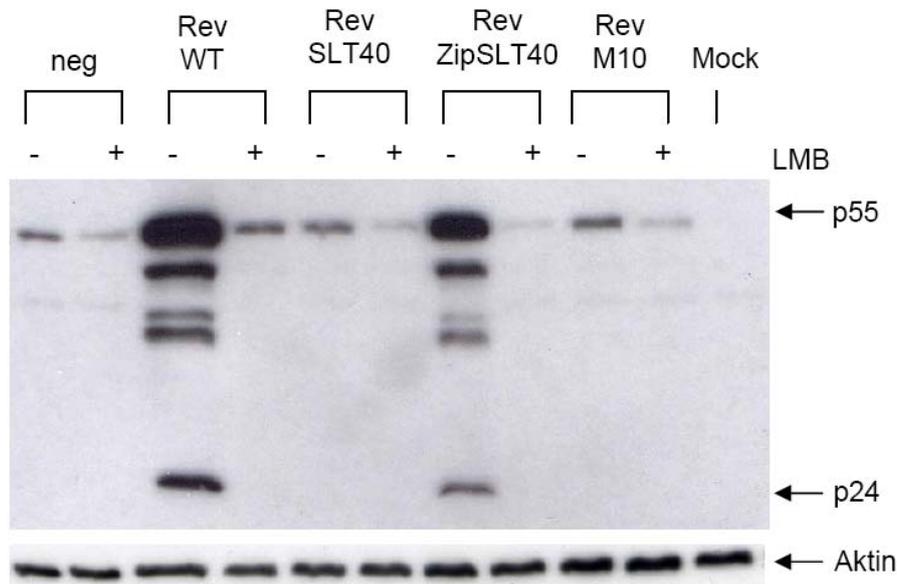


Abbildung 16: Inhibition der ZipRevSLT40 Transaktivierung durch LMB. Transiente Transfektion von HeLa Zellen mit pHXB2 Δ Bam und verschiedenen Rev Konstrukten. Hemmung des RRE/CRM1-abhängigen mRNA Exports durch LMB. Expressionsnachweis von Gag im Western Blot.

6.1.6 Einfluss der Rev Multimerisierung auf Rev *Shuttling* und CRM1 Interaktion

Die Fähigkeit von Rev zwischen Kern und Zytoplasma zu pendeln, ist die Voraussetzung für die Rev Transaktivierung. Der Kernexport des Proteins, auch in Abwesenheit von RRE RNA, erfolgt durch die Interaktion mit dem zellulären Kernexportrezeptor CRM1 (Fornerod *et al.*, 1997; Neville *et al.*, 1997). Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Rev Multimerisierung essentiell für den zytoplasmatischen Transport Rev-abhängiger RNA ist. Nun sollte untersucht werden, ob durch die Multimerisierung direkt das Rev *Shuttling* und die Interaktion mit CRM1 beeinflusst wird.

Das *Shuttling* von Rev wurde im Heterokaryonsystem untersucht (Meyer *et al.*, 1994). HeLa Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsvektoren für die Rev Mutanten transfiziert und anschließend mit murinen NIH3T3 Zellen fusioniert. Die Translokation in murine Zellkerne wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie mit Rev-spezifischen Antikörpern verfolgt und die Kerne über einen Hoechstfärbung visualisiert. Die murinen Zellen wiesen durch die Hoechstfärbung ein punktiertes Muster auf, wohingegen humane Zellen eine gleichmäßige Färbung der Zellkerne zeigten. Dies ermöglichte die eindeutige Differenzierung zwischen humanen und murinen Kernen bei der Immunfluoreszenzmikroskopie.

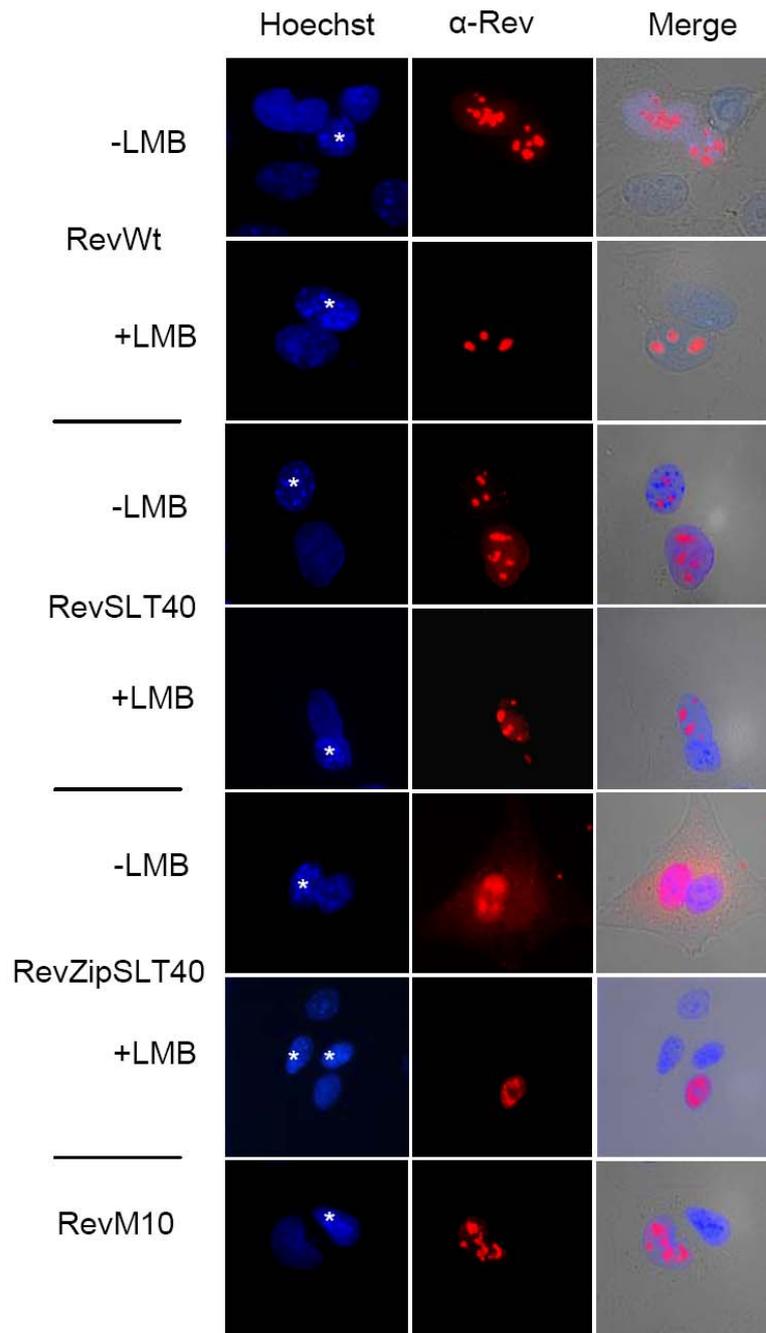


Abbildung 17: CRM1-abhängiger nukleozytoplasmatischer Transport von Rev Mutanten. Heterokaryonassay mit Rev Mutanten und Inhibition des CRM1 Exports durch LMB. Lokalisationsstudien durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie. Murinen Zellkerne sind durch ein (*) gekennzeichnet.

Die Heterokaryonstudien in Abbildung 17 zeigten, dass RevSLT40 genauso wie RevWT in humanen und murinen Kernen lokalisierte und somit *Shuttling*-kompetent war. Das *Shuttling* der RevSLT40 Monomere konnte wie beim RevWT durch LMB gehemmt werden. Die Multimerisierung beeinflusste somit nicht den Kernexport von Rev und die Interaktion mit CRM1. Auch ZipRevSLT40 wurde über die Interaktion mit CRM1 ins Zytoplasma transportiert. Auffällig war, dass die Dimersierungsmutante im *steady state* sowohl im

Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisierte. RevM10 war *per se* nicht in der Lage über CRM1 ins Zytoplasma transportiert zu werden und diente in den Heterokaryonexperimenten als Negativkontrolle.

6.1.7 Rekonstitution der biologischen Rev Aktivität durch chemisch-induzierte Homodimerisierung

Neben der Dimerisierung über den Leuzin-Zipper sollte der Einfluss eines weiteren Homodimerisierungsmotivs hinsichtlich der Rev Transaktivierung getestet werden. Zur kontrollierten Dimerisierung wurde das *Argent Regulated Homodimerization Kit* (ARIAD) verwendet. Hierfür wurde ein *FK Binding Protein* (FKBP) Motiv aminoterminal an RevWT und RevSLT40 fusioniert. Das FKBP Motiv dimerisierte nur in Gegenwart seines chemischen Substrats (AP20187).

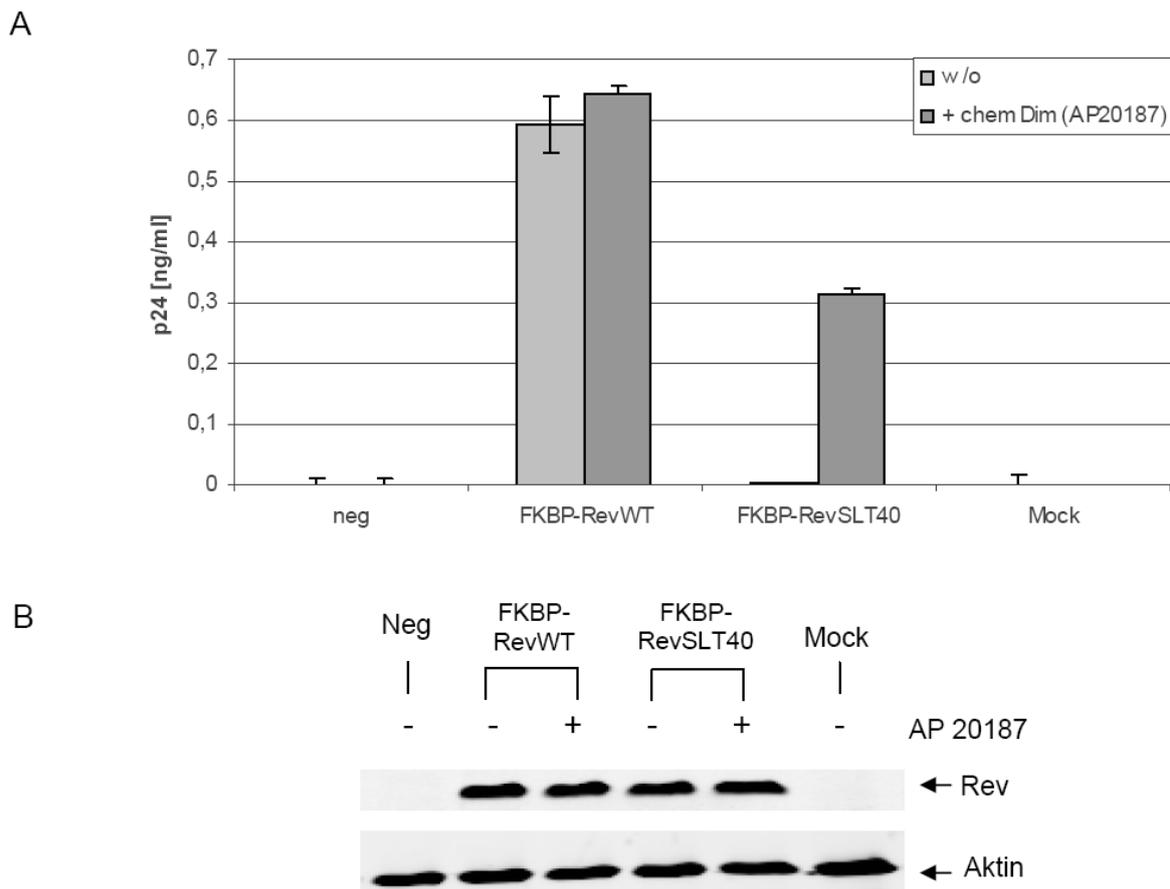


Abbildung 18: Rekonstitution der biologischen Aktivität von Rev Monomeren über ein chemisch-induzierbares Homodimerisierungsmotiv. Transiente Transfektion von HeLa Zellen mit p_{HXB2}ΔBam und FKBP-Rev Konstrukten. Induktion der Dimerisierung über den chemischen *Dimerizer* AP20187. Bestimmung der Viruspartikelmenge im Überstand im p24 Antigen ELISA.

6.1.8 Charakterisierung von Rev Heterodimerisierungsmutanten

Für weitere Experimente sollte ein System etabliert werden, mit dem Heterodimere, bestehend aus zwei unterschiedlichen Rev Mutanten, analysiert werden können. Insbesondere sollte untersucht werden, wieviele distinkte Aktivierungsdomänen in einem multimeren Rev Komplex benötigt werden. Basierend auf dem *Argent Regulated Heterodimerization Kit* wurden Rev Fusionsproteine generiert, die aminoterminal das Heterodimerisierungsmotiv EN-F1 oder RHE trugen. Durch das Substrat AP21967 kam es zur Bindung zwischen einem EN-F1 und einem RHE und somit zur induzierten Dimerisierung der entsprechenden Rev Mutanten. In den Heterodimerisierungsstudien wurde neben den zuvor beschriebenen Rev Mutanten zusätzlich die Doppelmutante RevSLT40M10 (Abbildung 19) untersucht, die somit weder in der Lage sein sollte zu *shutteln* noch zu multimerisieren.

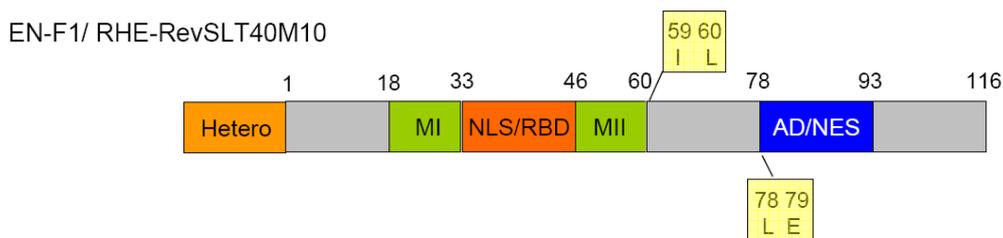


Abbildung 19: Schematische Darstellung der RevSLT40M10 Doppelmutante mit aminoterminalen Heterodimerisierungsmotiv EN-F1 oder RHE. Durch die beiden Mutationen sollte die Mutante weder in der Lage sein zu *shutteln* noch zu multimerisieren.

6.1.9 Einfluss der RevSLT40M10 Doppelmutante auf die RNA Bindung

Die RevSLT40M10 Mutante sollte darauf hin untersucht werden, inwieweit durch die beiden Mutationen die Fähigkeit zur RRE-RNA Bindung beeinflusst war. Die RNA Bindung wurde *in vivo* mit einem Tat-induzierbaren pSLIIB/CAT Reporter (Tiley *et al.*, 1992) analysiert. Hierfür wurden ein Tat/RevSLT40M10 Fusionsprotein generiert und mit anderen, bereits im Labor vorhandenen Tat/Rev Fusionsproteinen, verglichen. HeLa Zellen wurden mit dem SLIIB/CAT Reporterplasmid und den Tat/Rev Expressionsvektoren transfiziert. Als interne Kontrolle diente das Expressionsplasmid p β GAL. Die CAT Expression wurde durch die Bindung von Tat/Rev an das SLIIB des Reporters aktiviert und im CAT ELISA quantifiziert. Die CAT Niveaus wurden zur Auswertung an die β -GAL Expression angepasst.

Die Fähigkeit der RevSLT40M10 Mutante, an das SLIIB Motiv des RRE zu binden, war nicht beeinflusst (Abbildung 20). Insgesamt zeigen alle Mutanten eine zum RevWT vergleichbare Affinität für das SLIIB Motiv. Wie auch schon in vorherigen Studien nachgewiesen wurde,

spielt die Multimerisierung keine Rolle bei der initialen Bindung von Rev an das RRE der viralen mRNA. Als Negativkontrolle diente RevM5, eine zuvor beschriebene RRE Bindungsdefiziente Rev Mutante (Tiley *et al.*, 1992). Hierbei kam es zu keiner Aktivierung der CAT Expression.

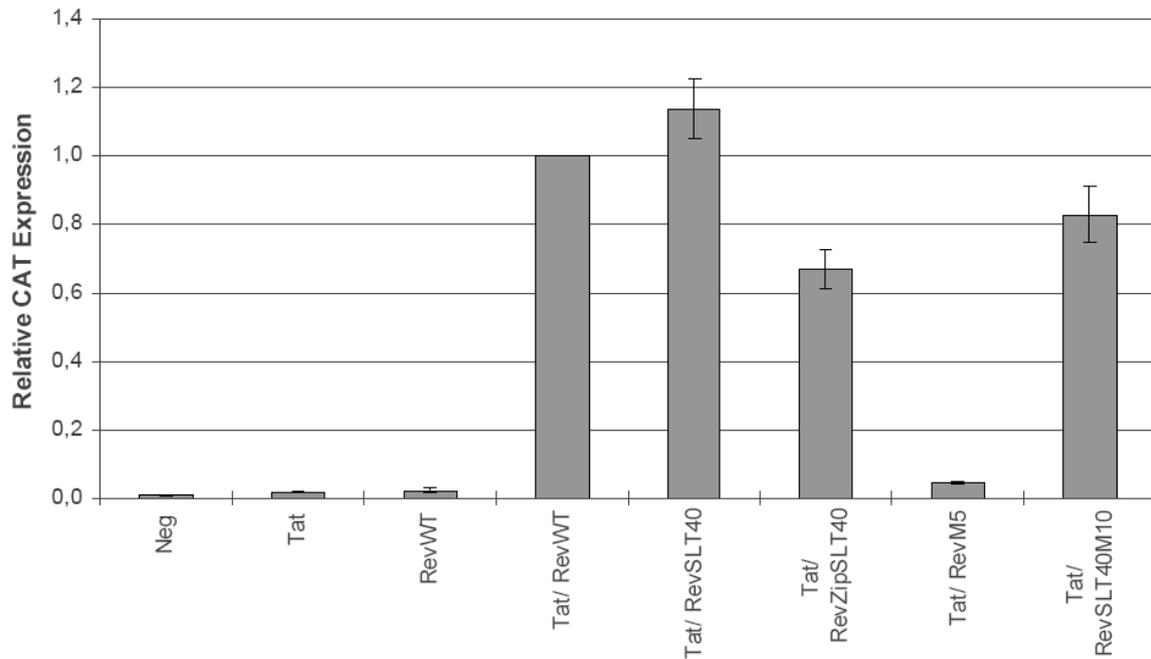


Abbildung 20: *In vivo* RRE Bindungsstudien mit Tat/Rev Fusionsproteinen. Transiente Transfektion von HeLa Zellen mit pSLIIB/CAT Reporter und Expressionsvektoren für Tat/Rev Mutanten. Analyse der RRE-SLIIB Bindung über die Tat/Rev-vermittelten CAT Expression im CAT ELISA.

6.1.10 Biologische Aktivität der chemisch-induzierbaren Rev Heterodimere

COS-7 Zellen wurden mit dem GPV-RRE Reporter, dem SEAP Vektor und einer Kombination aus den EN-F1- und RHE-Rev Heterodimerisierungsstrukturen transfiziert. Die Zellen wurden mit oder ohne AP21967 (500 ng/ml) für 30 Stunden kultiviert. Die Partikelproduktion wurde im p24 Antigen ELISA dokumentiert und für die Auswertung auf die SEAP Expression angepasst. Dazu wurde die Expressionsstärke der verschiedenen Rev Konstrukte im Western Blot dargestellt.

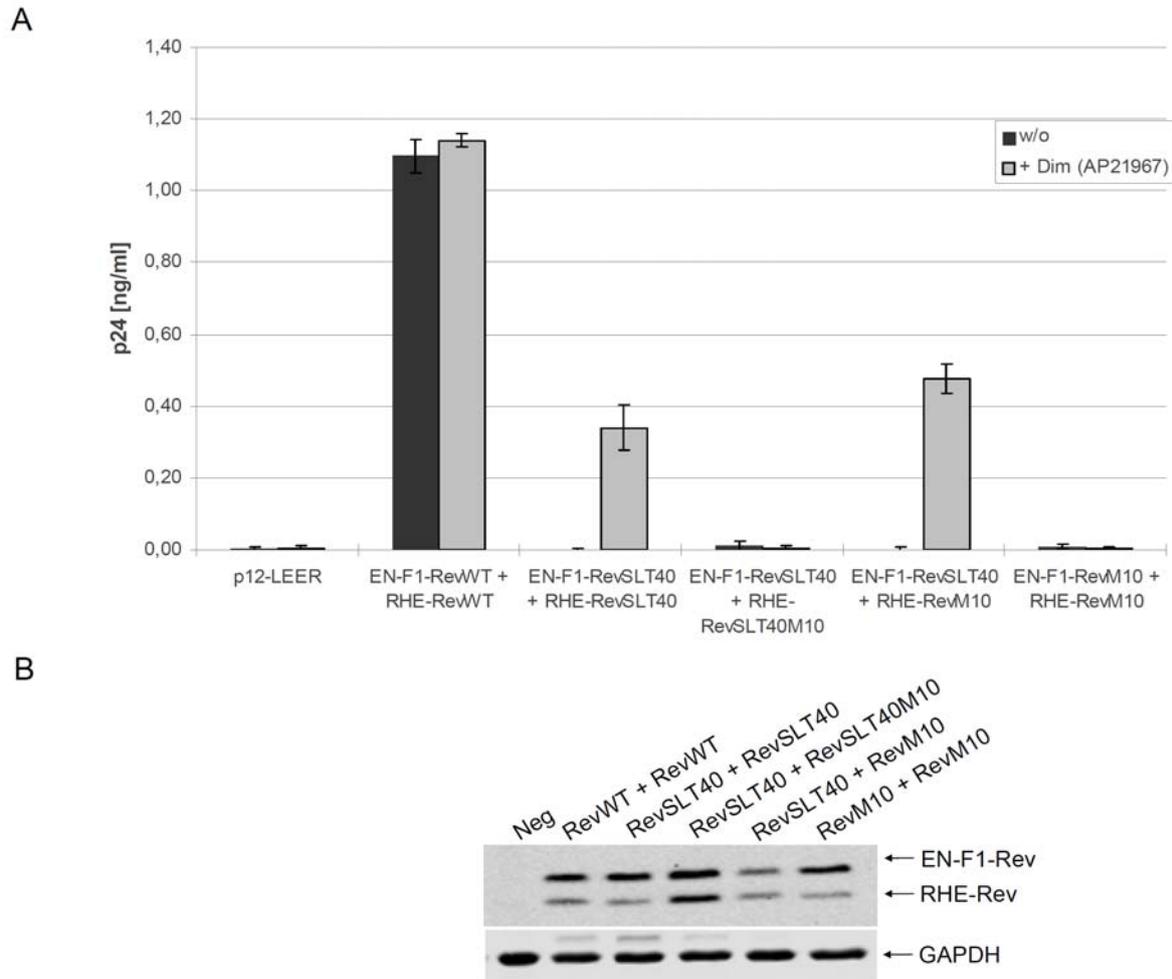


Abbildung 21: Rev Transaktivierung über chemisch-induzierbare Heterodimerisierungsmotive. Transiente Transfektion von COS-7 Zellen mit pGPV-RRE und Expressionsvektoren für EN-F1- und RHE-Rev Fusionsproteine. Induktion der Dimerisierung über den chemischen Dimerizer AP21967. (A) Bestimmung der Rev-abhängigen Partikelproduktion im p24 Antigen ELISA. (B) Bestimmung der Expression von der Rev Konstrukte nach Induktion der Dimerisierung durch AP21967 (EN-F1-Rev + RHE-Rev).

Wie die vorherigen Experimente bereits zeigten, war auch im Heterodimerisierungsansatz ein Dimer aus zwei RevSLT40 Mutanten eindeutig biologisch aktiv, wodurch es zu Viruspartikelproduktion kam (Abbildung 21 A). Auch der Ansatz mit RevSLT40 und RevM10 zeigte biologische Aktivität. Da RevM10 aber *per se* multimerisieren konnte, handelte es sich hierbei vermutlich nicht um ein Dimer sondern um ein RevM10 Multimer mit mehreren Heteromultimerisierungsmotiven. Dies könnte zur Entstehung von höheren Komplexen aus jeweils zwei oder mehr RevM10 und RevSLT40 Molekülen geführt haben. Das Dimer aus RevSLT40 und RevSLT40M10 mit nur einer funktionellen Aktivierungsdomäne zeigte keine biologische Aktivität. Dies legte nahe, dass für die Transaktivierung ein Dimer mit zwei funktionellen Aktivierungsdomänen/NES notwendig war.

Die Western Blot Analyse in Abbildung 21 B ergab, dass alle Rev Konstrukte vergleichbar in Anwesenheit des Dimerisierungsinduktors AP21967 exprimiert wurden.

6.2 Die Rolle von zellulären Kofaktoren bei der Rev Transaktivierung

6.2.1 Identifizierung von zellulären humanen Faktoren im murinen System

Für die Charakterisierung von putativen zellulären Kofaktoren bei der Rev Transaktivierung wurde ein murines 3T3 Zellsystem ausgewählt. Die Grundlage dazu bildete eine Studie, die einen direkten Zusammenhang zwischen Gag Prozessierung und Assemblierung von Virionen und dem durch die *gag* RNA beschrifteten Kernexportweg herstellt (Swanson *et al.*, 2004). Es wurde belegt, dass murine 3T3 Zellen das Gag Vorläuferprotein p55 exprimierten, allerdings, im Gegensatz zu humanen HeLa Zellen, nicht den Transport von Gag zur Zellmembran und dessen Prozessierung durch proteolytische Spaltung und die Assemblierung von HIV unterstützten. Interessanterweise konnte durch die Substitution des HIV-1 RRE durch das Rev-unabhängige CTE (*Constitutive Transport Element*) des MPMV (*Mason Pfizer Monkey Virus*) die Gag Prozessierung und die Partikelproduktion wiederhergestellt werden. Die nukleozytoplasmatische Translokation der *gag* mRNA erfolgte in diesem Fall über den TAP/p15 Exportweg und somit unabhängig von Rev und dem Kernexportrezeptor CRM1.

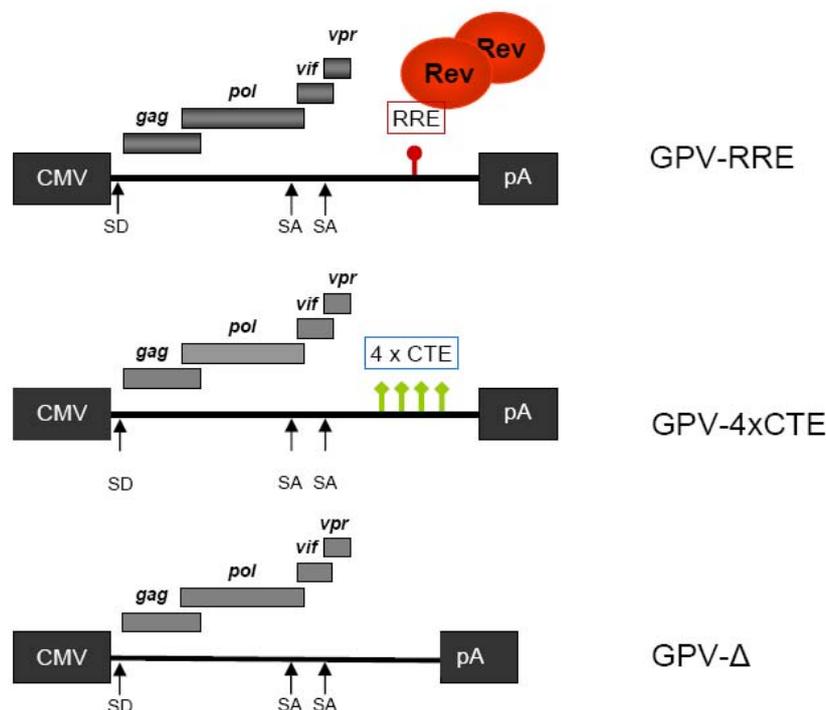


Abbildung 22: HIV Gag-Pol-Vif Konstrukte. GPV-4xCTE, GPV-RRE und GPV-Δ befinden sich in einem pcDNA3 Vektor unter der Kontrolle eines CMV-IE Promotors. Die Spleißdonor und Spleißakzeptorstellen sind markiert (Swanson *et al.*, 2004)

In den hier durchgeführten Studien wurden spezielle subgenomische GPV Vektoren verwendet, die für das *gag/pol* und *vif* Gen von HIV-1 kodierten (Abbildung 22). Gag wurde wie beim Provirus von einer ungespleißten RNA exprimiert, allerdings waren die Vektoren so konstruiert, dass der bekannte Transkriptionsblock in murinen Zellen unter Verwendung eines CMV-IE Promotors umgangen wurde (Garber *et al.*, 1998; Kotsopoulou *et al.*, 2000). Durch die Expression und effiziente Prozessierung von Gag kam es zur Produktion von virusähnlichen Partikeln (VLP- *Virus Like Particles*), die im p24 Antigen ELISA bestimmt werden konnten. Die Vektoren beinhalteten das Rev-abhängige RRE, eine vierfache Tandemkopie des Rev-unabhängigen CTE (4xCTE) oder kein Exportelement.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Prozessierung von Rev-abhängigen Transkripten und den darin kodierten Gag Strukturproteinen zelluläre Faktoren erforderte, die im murinen System nicht vorhanden oder nicht funktional waren. Unter diesem Aspekt sollte die Funktion humaner putativer Kandidatenproteine (Kap. 2.8.4) bei der Proteinexpression, Prozessierung und bei der Viruspartikelproduktion untersucht werden.

NIH3T3 Zellen wurden hierfür mit pGPV-RRE und verschiedenen Expressionsvektoren für potentielle humane Rev Kofaktoren transfiziert. Der pGPV-4xCTE Vektor diente als Positivkontrolle und pSEAP wiederum als interner Standard. Es wurde die Partikelproduktion im p24 Antigen ELISA bestimmt und für die Auswertung auf die Expression von SEAP nivelliert.

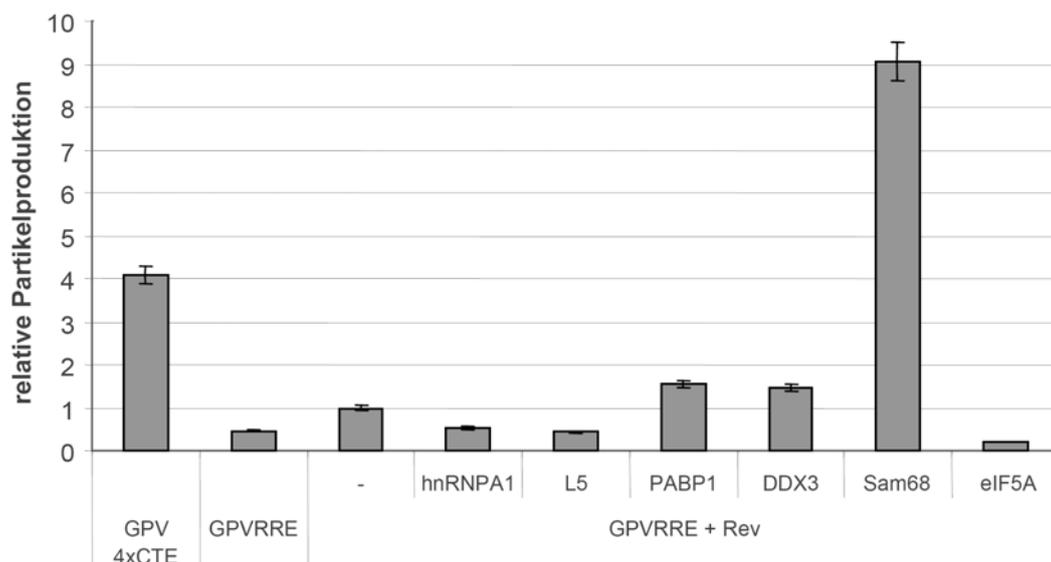


Abbildung 23: Analyse von putativen Rev Kofaktoren auf die Partikelproduktion des Rev-abhängigen GPV Reporters. Transiente Transfektion von NIH3T3 Zellen mit pGPV-4xCTE, pGPV-RRE und GPV-RRE + pRev sowie Expressionsvektoren für putative humane Rev Kofaktoren. Bestimmung der VLP Produktion im p24 Antigen ELISA.

Die Expression des humanen Sam68, eines RNA-bindenden Proteins (Lukong *et al.*, 2003), steigerte in diesem Experiment signifikant die Rev-abhängige Produktion von Partikeln in murinen Zellen (Abbildung 23). Sam68 wurde schon in humanen Zellsystemen als potentieller zellulärer Kofaktor von Rev beschrieben (Reddy *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002a).

6.2.2 Spezies-spezifischer Einfluss von Sam68 auf die Prozessierung und Assemblierung Rev-abhängiger Transkripte

Es sollte analysiert werden, ob Sam68 im Maussystem entweder nicht ausreichend exprimiert wurde oder grundsätzlich inaktiv war. Hierfür wurden Flag Epitop-markierte Expressionsvektoren generiert, in denen die cDNA für humanes Sam68 aus HeLa Zellen oder murines Sam68 aus NIH3T3 Zellen in den Expressionsvektor pcDNA3 integriert wurden. Die Funktion von Sam68 sollte dosisabhängig hinsichtlich der HIV-1 Rev Funktion untersucht werden.

NIH3T3 Zellen wurden dazu mit dem Vektor pGVP-RRE und steigenden Mengen an Sam68 Expressionsvektoren transfiziert. Die DNA Mengen wurden durch Zugabe des pcDNA3 Leervektors ausgeglichen. Der Vektor pGPV-4xCTE diente als Positivkontrolle und pSEAP wurde als interne Transfektionskontrolle verwendet. Die Partikelproduktion wurde mit einem p24 Antigen ELISA bestimmt und auf die SEAP Sekretion eingestellt. Die Prozessierung des HIV-1 Gag Vorläuferproteins p55 wurde im Western Blot mittels spezifischer Antikörper dargestellt, die ein Epitop im Kapsid (p24) erkannten. Die transiente Expression von Sam68 wurde mit Hilfe eines spezifischen Flag Antikörpers und die Gesamtmenge an Sam68 mit einem spezifischen Sam68 Antikörper analysiert.

Die p24 Antigen ELISA Ergebnisse in Abbildung 24 zeigten, dass sowohl murines als auch humanes Sam68 die Partikelproduktion dosisabhängig steigerte. Ebenso konnte eine erhöhte Prozessierung von p55 zu p24 im Western Blot durch die Überexpression der beiden Sam68 Spezies beobachtet werden. Interessanterweise exprimierten die murinen Zellen allgemein hohe Mengen an endogenem Sam68. Durch die exogene Überexpression von Sam68 kam es nur zur leichten Steigerung der Gesamtmengen an Protein in NIH3T3 Zellen (Abbildung 24). Insgesamt wies das murine System keine genetische oder regulatorische Fehlfunktion von Sam68 auf.

Deutlich wurde, dass eine erhöhte basale Expression von Gag mit dem pGPV-RRE Reporter auch in Abwesenheit von Rev in NIH3T3 Zellen auftrat, was auf einen gewissen *leaking* Effekt beim Export (d.h. Rev-unabhängiger Kernexport) der *gag* RNA hindeutete. Weiterhin fiel auf, dass die Signalstärke der p55 Bande nicht mit der Partikelproduktion und der Prozessierung korrelierte. Hierbei nahm die Prozessierung zu, die Signalstärke der p55 Bande blieb allerdings konstant, was auf eine schnelle Kinetik bei der proteolytischen

Spaltung hindeutete. Insgesamt konnte in diesem System nicht eindeutig zwischen Gag Expression und Gag Prozessierung unterschieden werden.

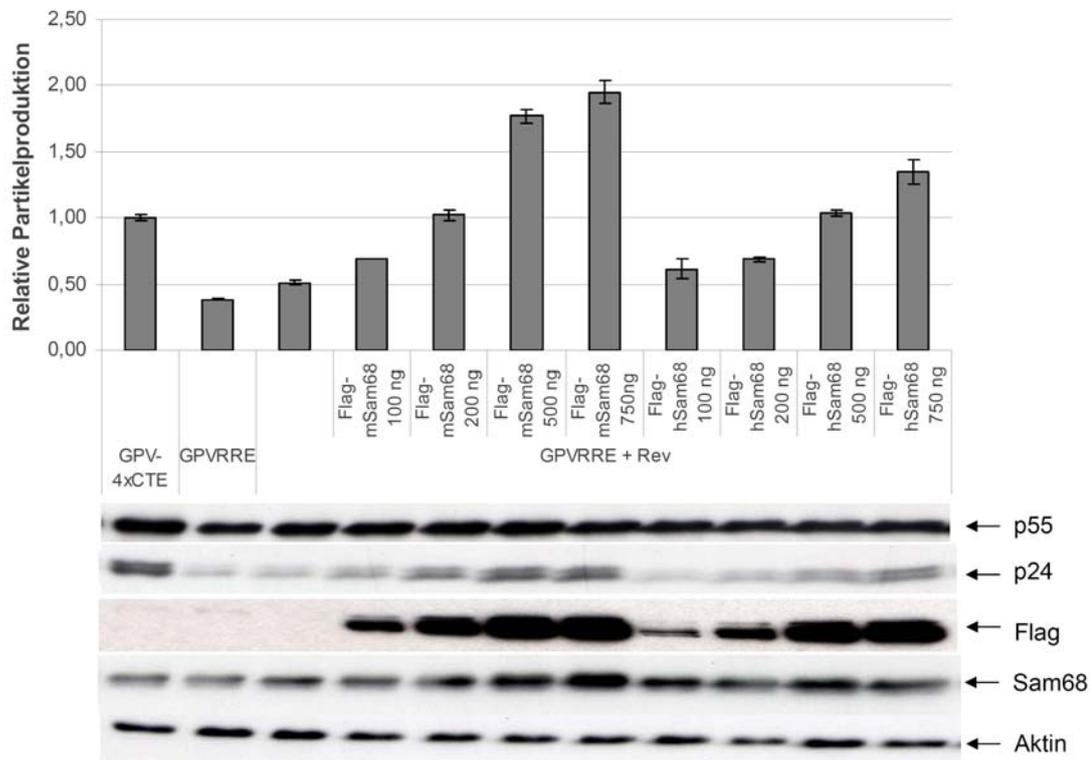


Abbildung 24: Einfluss von murinem und humanem Sam68 auf die Rev-abhängige Gag Prozessierung und Partikelproduktion. NIH3T3 wurden transient mit pGPV-RRE, pRevWT und ansteigenden Mengen an murinen und humanen Flag-Sam68 Expressionsvektoren transfiziert. Bestimmung der Partikelproduktion im p24 Antigen ELISA und der Gag Prozessierung im Western Blot.

6.2.3 Effekt von Sam68 auf die Expression von Rev-abhängiger mRNA

Sam68 steigerte signifikant die Prozessierung von Rev-abhängigen Transkripten und den darin kodierten Strukturproteinen, sowie die Assemblierung der Virionen. Wie bereits erwähnt, konnte mittels der pGPV Reporter nicht eindeutig unterschieden werden, ob Sam68 dabei einen direkten Effekt auf das posttranslationale Ereignis der Prozessierung von Gag ausübte oder ob es insgesamt die Gag Expression steigerte und dadurch mehr Viruspartikel produziert wurden. Die Funktion von Sam68 wurde mit dem pDM128/CAT Reporter analysiert. Im Gegensatz zum pGPV-RRE Reporter konnte damit, unabhängig von der Prozessierung, der direkte Einfluss von Sam68 auf die Expression ungespleißter Rev-abhängiger mRNA untersucht werden.

NIH3T3 Zellen wurden transient mit pDM128/CAT, pRevWT und p β GAL als interne Kontrolle transfiziert. Zusätzlich wurde die Zellen mit 500 ng Expressionsvektoren für murines und humanes Sam68 transfiziert. Die CAT Expression wurde im CAT ELISA quantifiziert und für die Auswertung auf die interne β Gal Aktivität normiert, die in einer enzymatischen Farbreaktion bestimmt wurde.

Das murine und humane Sam68 steigerten deutlich die CAT Expression im murinen Zellsystem unabhängig von posttranskriptionalen Ereignissen (Abbildung 25). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch die gesteigerte Partikelproduktion bei den Experimenten mit GPV Reportern zum großen Teil durch die Expressionssteigerung der *gag* Transkripte hervorgerufen wurde.

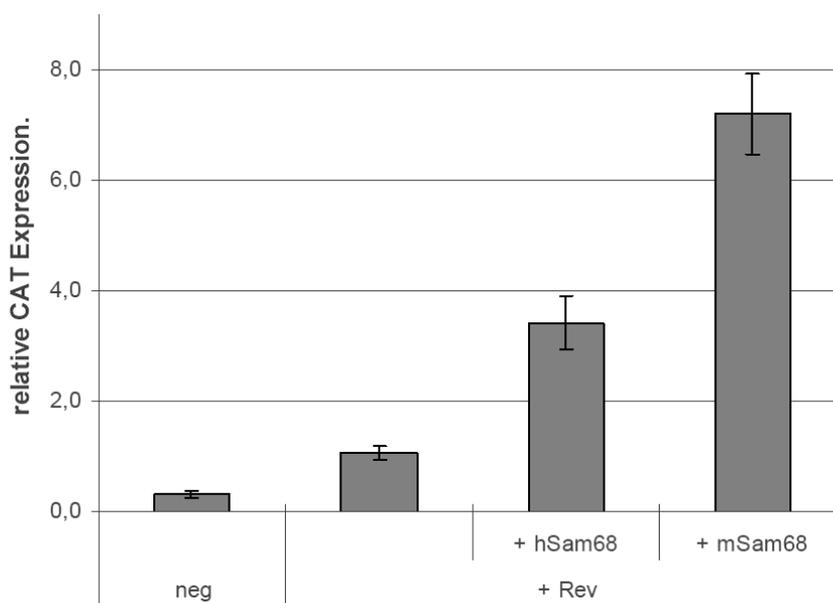


Abbildung 25: Einfluss von murinem und humanem Sam68 auf die Expression von Rev-abhängiger ungespleißter RNA. Transiente Transfektion von NIH3T3 Zellen mit pDM128/CAT, pRevWT und Expressionsvektoren für humanes oder murines Sam68.

6.2.4 Effekt von Sam68 auf die Funktion des MPMV CTE

Der Effekt von Sam68 auf die Gag Expression und Assemblierung von Virionen sollte auch mit dem CTE-abhängigen Reporter pGPV-4xCTE getestet werden. Als Kontrolle diente ein Konstrukt, in dem das 4xCTE deletiert wurde bzw. das GPV-RRE Konstrukt, das in Abwesenheit von Rev analysiert wurde. Die Funktion von Sam68 auf die Virionenproduktion wurde hierbei sowohl in murinen NIH3T3 sowie in humanen HeLa Zellen untersucht.

NIH3T3 und HeLa Zellen wurden mit den jeweiligen GPV Reportervektoren, pSEAP und den Expressionskonstrukten für murines und humanes Sam68 transfiziert. Die Partikelproduktion wurde im p24 Antigen ELISA bestimmt und, wie zuvor beschrieben, bei der Auswertung auf die SEAP Expression normiert.

Wie in Abbildung 26 gezeigt steigerten humanes und murines Sam68 die Partikelproduktion von allen Reportern, unabhängig davon, welches *cis*-aktive mRNA Exportelement (z.B. CTE oder RRE) Bestandteil des *gag* Transkripts war. Die Daten deuteten an, dass Sam68 weder spezifisch am Rev/CRM1-vermittelten, noch am TAP/p15-vermittelten Kernexport der ungespleißten *gag* mRNA beteiligt ist.

Die Ergebnisse zeigten, dass Sam68 die Expression der Gag Konstrukte im murinen (Abbildung 26 A) sowie im humanen System (Abbildung 26 B) steigerte, wobei die Steigerung in NIH3T3 Zellen deutlicher ausfiel. Der zuvor erwähnte *leaking* Effekt beim mRNA Kernexport trat hierbei nur in den murinen NIH3T3 Zellen auf.

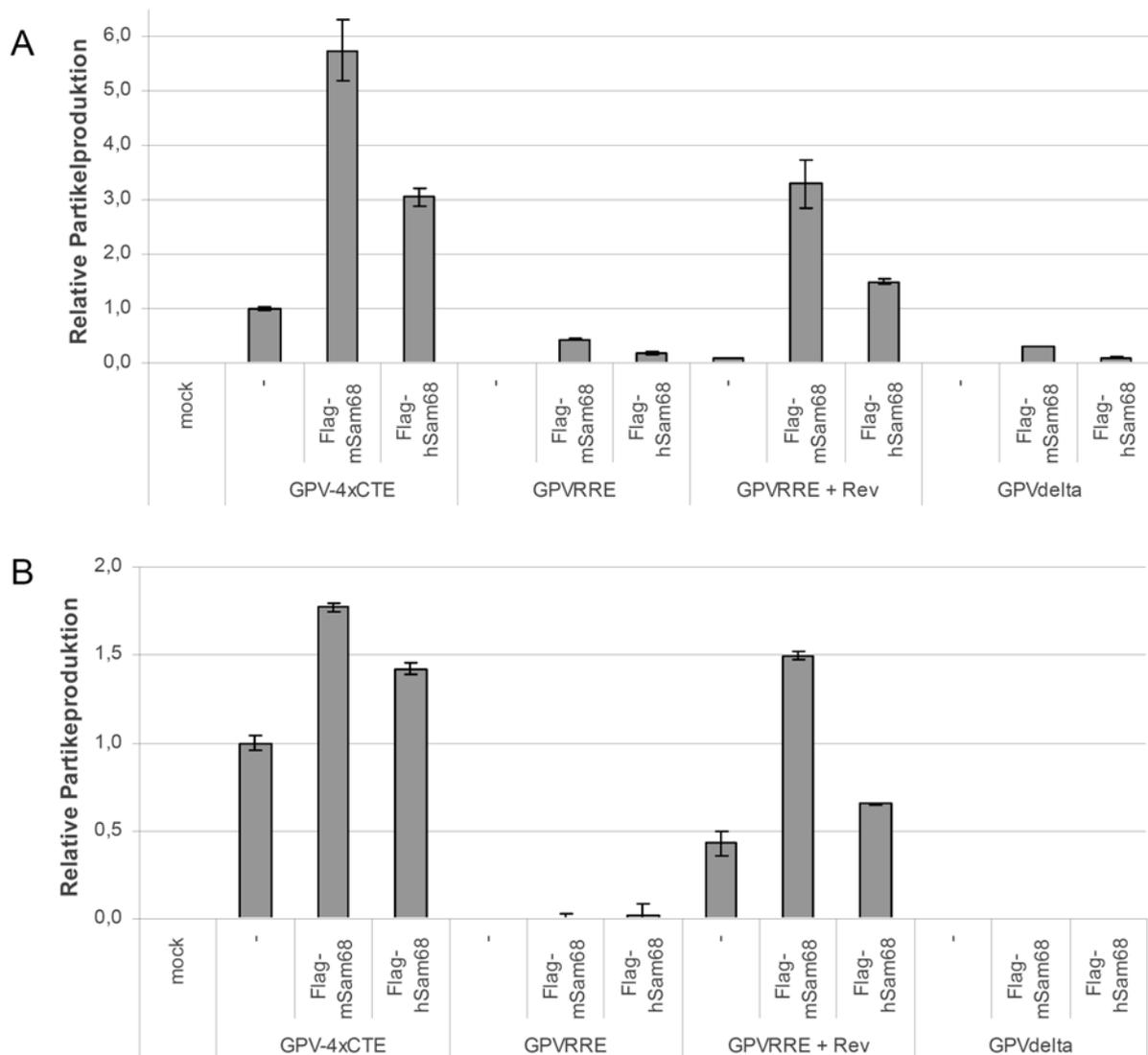


Abbildung 26: Funktion von Sam68 auf die Expression ungespleißter RNA im GPV Reportersystem. Transiente Transfektion von (A) NIH3T3 und (B) HeLa Zellen mit verschiedenen GPV Reportern und murinem und humanem Sam68. Bestimmung der Partikelproduktion im p24 Antigen ELISA. Die Werte wurden angepasst an die interne SEAP Kontrolle.

6.2.5 Funktionelle Charakterisierung von Sam68 auf die HIV-1 Replikation im permissiven humanen HLCD4-CAT System

Wie bereits in der Einleitung (Kap. 2.8.4) beschrieben, ist die Rolle, die Sam68 bei posttranskriptionalen Ereignissen im Replikationszyklus von HIV-1 spielt, sehr umstritten (Lukong *et al.*, 2003; Suhasini *et al.*, 2009).

Um die potentielle Rolle von Sam68 während der HIV-1 Replikation zu analysieren, wurde von dem artifiziellen murinen NIH3T3 System zu einem permissiven humanen HeLa System gewechselt. In den weiteren Studien wurden HLCD4-CAT Zellen (kurz HLCD4) verwendet, die durch retroviralen Gentransfer den CD4 Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren und dadurch mit HIV-1 infiziert werden können. Nebenbei beinhalten sie eine stabil integrierte Kopie des *cat* Gens, dessen Expression unter der Kontrolle eines HIV-1 LTR Promotors stand. Dadurch kann die Infektion dieser Zellen im mit HIV-1 im CAT Assay nachgewiesen werden.

6.2.6 Hemmung der Sam68 Expression durch ein lentivirales shRNA System

Vereinzelte Studien legen eine wichtige Rolle von Sam68 bei der HIV-1 Replikation nahe (Li *et al.*, 2002a; Modem *et al.*, 2005). Diese Studien beruhten auf dem *Silencing* der Sam68 Proteinexpression durch *Antisense* RNA oder durch Vektor-basierte siRNA. Auch in der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Strategie der RNA Interferenz (RNAi) genutzt werden, die Sam68 Expression zu reduzieren.

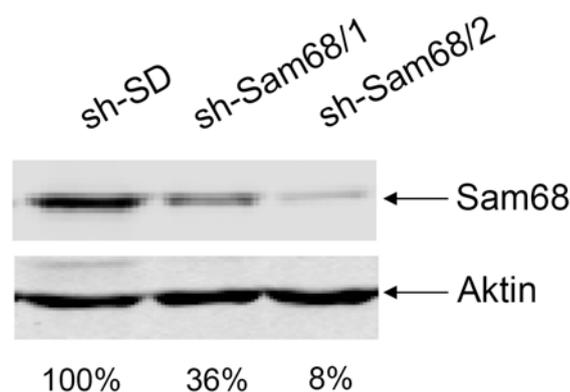


Abbildung 27: Sam68 *Knockdown* in HLCD4 Zellen. Expressionsnachweis von Sam68 im Western Blot. Prozentuale Angabe der relativen Sam68 Expression.

Es wurden ein lentiviral-basiertes shRNA System gewählt (Mission®shRNA, Sigma), um stabile HLCD4 Sam68 *Knockdown* Zellen zu generieren. Das shRNA System beinhaltete

einen lentiviralen Vektor (pLKO.1-Puro), der die shRNA und ein Puromycin-Resistenzgen kodierte. Durch Letzteres erfolgte die Selektion in den humanen Zellen. HLCD4 Zellen wurden mit Mission[®]shRNA Partikeln transduziert, welche spezifisch für Sam68 shRNA exprimierten oder Kontroll shRNA *scrambled duplex* (SD) enthielten. Die transduzierten Zellen wurden in Medium mit Puromycin (2 µg/ml) selektioniert und die Sam68 Expression mittels Western Blot Analyse des Gesamtzellextrakts untersucht.

Dabei zeigten besonders die beiden stabilen Zelllinien HLCD4 sh-Sam68/1 und sh-Sam68/2 einen deutlichen Sam68 *Knockdown* (Abbildung 27).

6.2.7 Effekt von Sam68 auf die HIV-1 Replikation in HLCD4 Zellen

Der Effekt von Sam68 auf die HI-Virusreplikation wurde in Transfektionsexperimenten mit dem Rev-defizienten Reporterplasmid pHXB2ΔBam in stabilen HLCD4-sh-SD, HLCD4-sh-Sam68/1 und HLCD4-sh-Sam68/2 Zellen analysiert. Die Zellen wurden mit pHXB2ΔBam und mit pRevWT oder parentalen Leervektor transfiziert. pSEAP diente als interne Kontrolle. Die Menge an Viruspartikel im Überstand wurde im p24 Antigen ELISA 60 h nach der Transfektion bestimmt.

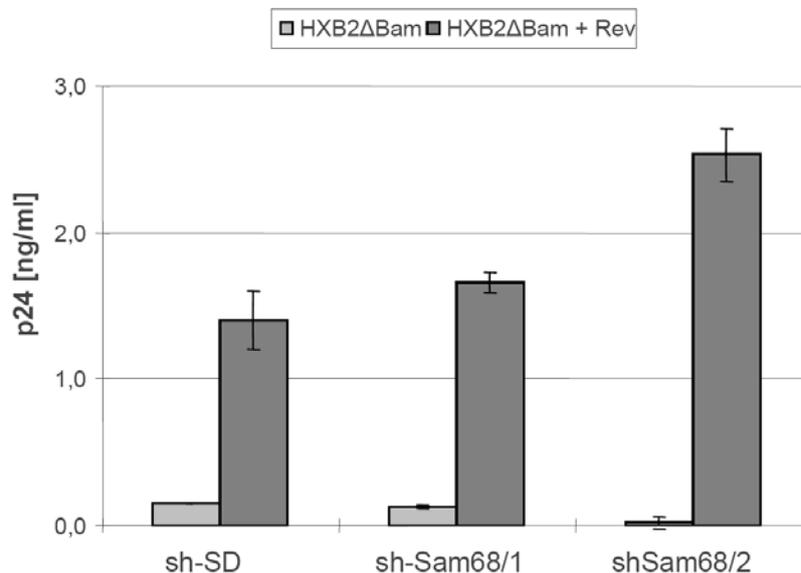


Abbildung 28: Untersuchung von Sam68 *Knockdown* Zellen mit einem proviralen HIV Reporter. Transiente Transfektion von stabilen HLCD4-sh-SD und HLCD4-sh-Sam68/1 und -Sam68/2 mit HXB2ΔBam und pRev oder parentalen Leervektor. pSEAP wurde als interne Kontrolle verwendet. Bestimmung der Partikelmenge im Überstand im p24 Antigen ELISA.

Wie in Abbildung 28 gezeigt, hatte die Reduktion der Sam68 Expression keinen negativen Einfluss auf die HIV-1 Assemblierung und Replikation im transienten Transfektionssystem.

Überraschenderweise kam es durch den Sam68 *Knockdown*, insbesondere in HLCD4-sh-Sam68/2 Zellen, zu einer Steigerung der Viruspartikelproduktion.

6.2.8 Einfluss von Sam68 auf die Replikation in HIV-1 Infektionsexperimenten

Die Transfektionsexperimente mit dem proviralen Reporter standen im Widerspruch zu verschiedenen vorherigen Studien (Li *et al.*, 2002a; Modem *et al.*, 2005).

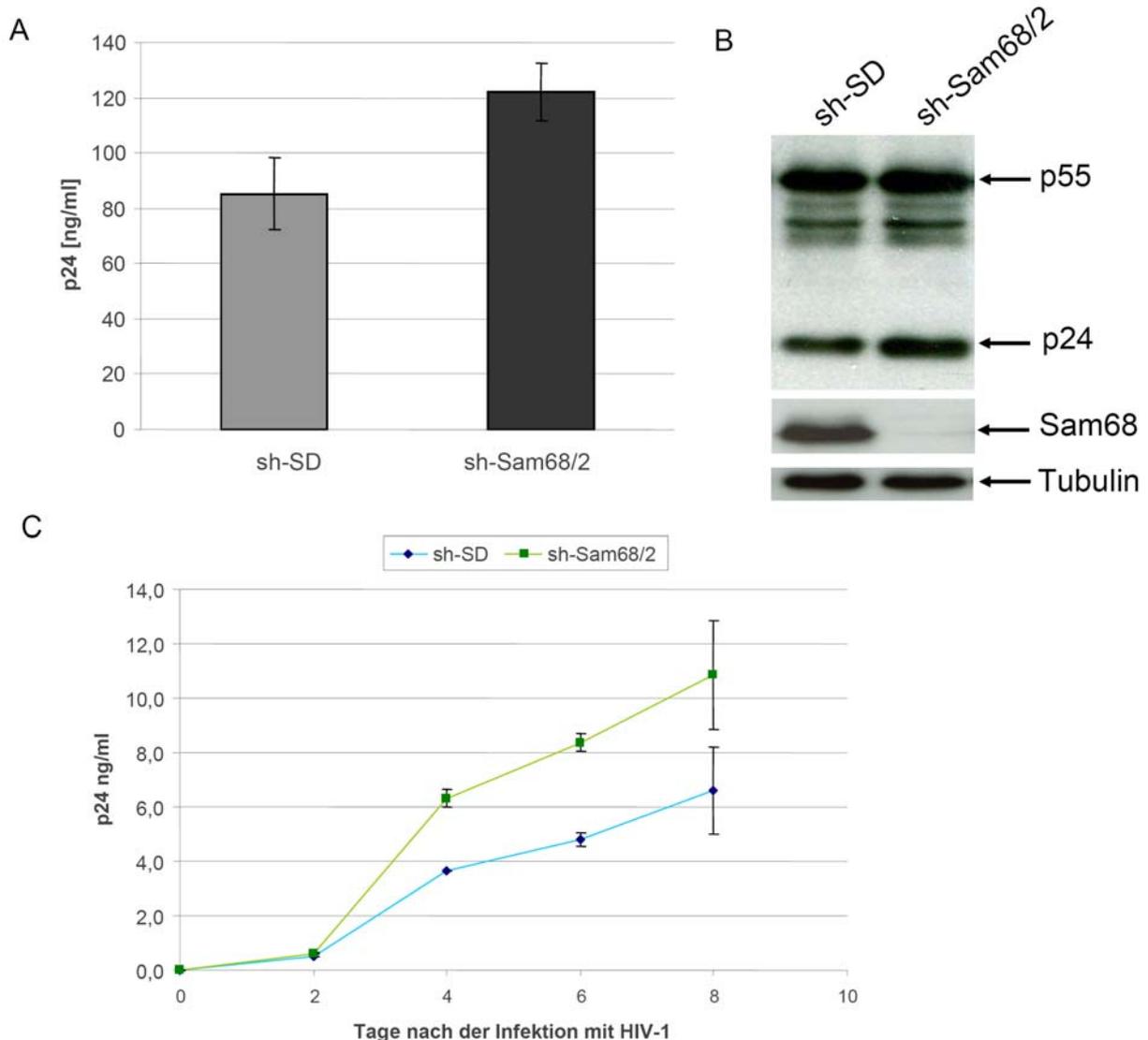


Abbildung 29: Einfluss des Sam68 *Silencing* auf die HIV Replikation. Infektion von stabilen Sam68 *Knockdown* Zellen mit (A-B) HIV-1 NL4/3 Δ env und (C) HIV-1 NL4/3 Wildtyp. Die mit pseudotypisierten Virus infizierten Zellen wurde hinsichtlich der (A) Produktion von Virionen im p24 Antigen ELISA und in Bezug auf die (B) Die Gag Expression wurde im Western Blot untersucht. Ein Sam68 Antikörper diente als *Knockdown* Kontrolle. (C) Die Partikelmenge im Überstand von HIV1 infizierten Zellen wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen dokumentiert.

Deshalb wurden die Kontrollzelllinie HLCD4-sh-SD und die *Knockdown* Zelllinie HLCD4-sh-Sam68/2 in Infektionsexperimenten mit HIV-1 detaillierter untersucht. Die Zellen wurden mit pseudotypisierten VSV-G/HIV-1 (HIV-1 NL4/3 Δ env) infiziert. Mit den entsprechenden NL4/3 *env*-minus HI-Viren konnten HLCD4 Zellen infiziert werden. Eine Deletion im homologen HIV-1 *env* Gen führte dazu, dass von den infizierten Zellen keine infektiösen Partikel ins Medium abgegeben wurden. Es handelte sich demnach um ein „*First Round of Infection*“ Experiment. Die Gag Expression wurde im Western Blot dargestellt und die Replikation als Viruspartikel im Überstand im p24 Antigen ELISA untersucht. Zusätzlich wurden die beiden stabilen HLCD4 Linien mit infektiösem HIV-1 NL4/3 Wildtypvirus infiziert und die Replikation über 8 Tage dokumentiert. Hierbei wurden die Virionen wiederum im Überstand im p24 Antigen ELISA quantifiziert.

Wie in den Abbildung 29 A-C dargestellt, hemmte die Reduktion der Sam68 Expression auch in diesen Infektionsstudien weder die Gag Expression noch die HIV Replikation. Wie in den transienten Studien kam es durch das Sam68 *Silencing* auch hier zur erhöhten Virusproduktion.

6.2.9 Sam68 *Silencing* in ACH-2 Zellen und HIV Replikation

Wie gezeigt, beeinflusste das Sam68 *Silencing* nicht die HIV-1 Replikation in HLCD4 Epithelzellen. Diese Ergebnisse sollten deshalb in einem physiologisch relevanten Zellsystem, wie T-Lymphozyten, welche eine natürliche Zielzelle der HIV Infektion repräsentieren, untersucht werden. Hierfür wurden stabile ACH-2 Sam68 *Knockdown* Zellen mit dem lentiviralen Mission®shRNA System generiert. ACH-2 Zellen sind latente HIV-1 Klone, abgeleitet von der humanen T-Zelllinie CEM, und produzieren bzw. sezernieren konstant HIV-1 Virionen. Die generierten ACH-2-sh-SD und ACH-2-sh-Sam68/1 und ACH-2-sh-Sam68/2 Zellen wurden ausgesät und die Viruspartikelproduktion über einen Zeitraum von 12 Tagen dokumentiert.

Der Sam68 *Knockdown* zeigte auch in der humanen T-Lymphozytenzelllinie ACH-2 keinen negativen Einfluss auf die Replikation (Abbildung 30). Die Reduktion der Sam68 Expression führte mit beiden shRNAs wie in HLCD4 Zellen eher zu einer gesteigerten Virusfreisetzung, anstatt sie negativ zu beeinflussen.

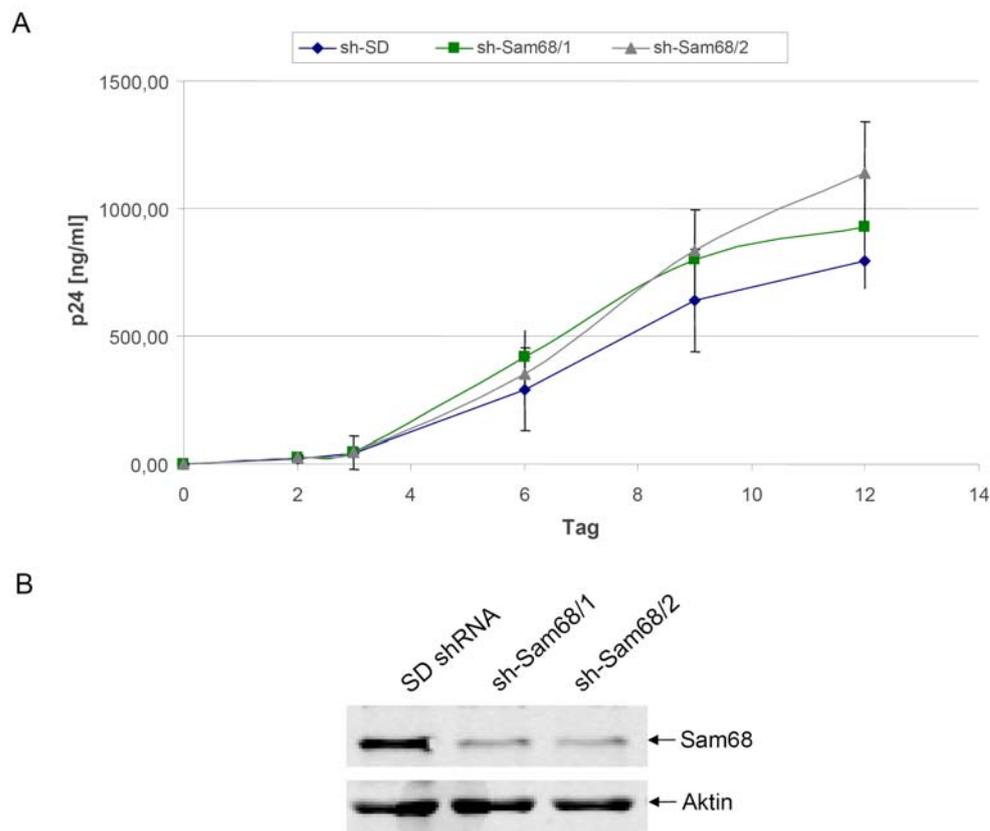


Abbildung 30: Einfluss von Sam68 auf die HIV-1 Replikation in humanen Lymphozyten. (A) Bestimmung der Partikelproduktion von stabilen ACH-2 SD- und Sam68 *Knockdown* Zellen über einen Zeitraum von 12 Tagen. (B) Bestimmung der Sam68 Expression in stabilen ACH-2 Zellen im Western Blot.

6.2.10 Expression von SLM1 und SLM2 in HLCD4 Zellen

Der Sam68 *Knockdown* zeigte keinen negativen Effekt auf die Virusreplikation von HIV-1. Es wurden jedoch in der Literatur zwei weitere Sam68-verwandte Proteine beschrieben, SLM1 und SLM2 (*Sam68-like mammalian protein 1 and 2*), die eine distinkte Rolle in der HIV-1 Regulation spielen sollen. In Transfektionsstudien mit Rev-abhängigen Reportern zeigten die beiden Proteine einen vergleichbaren Phänotyp wie Sam68 und steigerten die Gag Expression von Rev-abhängigen RRE Transkripten sowie Rev-unabhängigen CTE Transkripten (Soros *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2002). Sam68, SLM1 und SLM2 gehören gemeinsam zur Familie der *Signal Transduction and Activation of RNA* (STAR) Proteine (Lukong *et al.*, 2003).

Aufgrund der Sam68-RNAi Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese beiden Sam68-ähnlichen Proteine die Funktion von Sam68 in den stabilen HLCD4 *Knockdown* Linien kompensieren konnten. Die mRNA Expression dieser beiden Proteine wurde deshalb in den stabilen Linien mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Für die semiquantitative RT-PCR wurden zuvor etablierte Primerpaare für den Expressionsnachweis von SLM1 und

SLM2 verwendet (Wang et al., 2002b; Cohen *et al.*, 2005), die in Vorexperimenten hinsichtlich der exogenen Expression dieser beiden RNA-bindenden Proteine durch Plasmid DNA getestet wurden (Daten nicht gezeigt).

Es wurde deutlich, dass SLM1 in den HLCD4 Zellen nicht detektierbar war. SLM2 dagegen wurde in HLCD4 Zellen exprimiert, wie in der semiquantitativen RT-PCR gezeigt werden konnte (Abbildung 31). Interessanterweise war die Expression von SLM2 in den HLCD4-sh-Sam68/2 Zellen deutlich gesteigert. Dies ließ vermuten, dass durch die Reduktion der Sam68 Expression die SLM2 Expression aufgrund zellulären Selektionsdrucks gesteigert wurde.

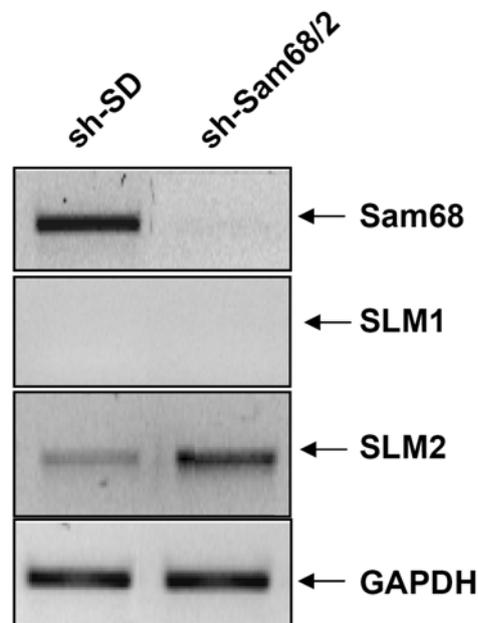


Abbildung 31: Expression von Sam68, SLM1 und SLM2 in stabilen HLCD4 Zellen. Die Expression der mRNA wurde über semiquantitative RT-PCR bestimmt.

6.2.11 Reduzierung der SLM2 Expression durch ein lentivirales shRNA System

Die Funktion von SLM2 in der HIV-1 Replikation sollte nun durch RNAi Studien untersucht werden. Dazu wurde ebenfalls das lentiviral-basierte shRNA System (Mission[®] shRNA, Sigma) genutzt, um stabile HLCD4 SLM2 *Knockdown* Zellen zu generieren. Das Puromycin-Resistenzgen im pLKO.1 Vektor wurde zudem durch ein Blastocin-Resistenzgen ausgetauscht. HeLaCD4 Zellen wurden mit Mission[®] shRNA Partikeln spezifisch für SLM2 shRNA und *scrambled duplex* (SD) shRNA transduziert. Die transduzierten Zellen wurden in Medium mit Blastocidin (5 µg/ml) selektioniert und die SLM2 Expression durch *Realtime* RT-PCR quantifiziert (Cohen *et al.*, 2005).

Wie in Abbildung 32 gezeigt, war in den Zelllinien HLCD4-sh-SLM2/1 und HLCD4-sh-SLM2/2 die SLM2 mRNA Expression gegenüber der Kontrolle HLCD4-sh-SD um 60 – 70% reduziert. Diese Zellen wurden daraufhin für die weiteren Studien verwendet.

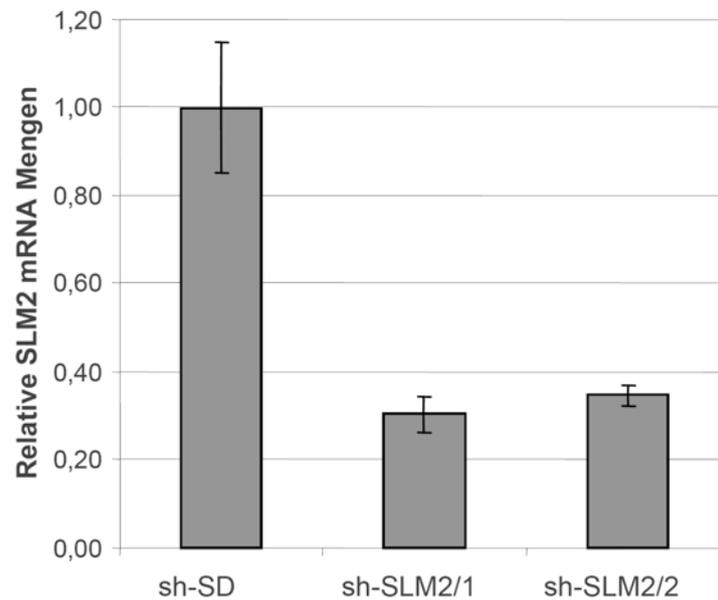


Abbildung 32: Nachweis der SLM2 Expression in *Knockdown* Zellen. Die Menge an SLM2 mRNA wurde mittels *Realtime* RT-PCR bestimmt und auf die GAPDH mRNA Expression angepasst.

6.2.12 Einfluss von SLM2 auf die transiente Expression von HXB2ΔBam

Wie in den Sam68 RNAi Studien wurde der Einfluss von SLM2 auf die HIV-1 Replikation mit dem einem proviralen Reporter untersucht. Die transienten Transfektionsexperimente wurden mit dem Expressionsvektor pHXB2ΔBam und pRevWT wie zuvor beschrieben durchgeführt (Kap. 5.2.7).

In den beiden SLM2 *Knockdown* Zelllinien HLCD4-sh-SLM2/1 und HLCD4-sh-SLM2/2 kam es zu einer Hemmung der Viruspartikelproduktion von 40 – 50% im Vergleich zur Kontrolle Zelllinie HLCD4-sh-SD (Abbildung 33). Dies deutete auf einen Rolle von SLM2 bei der HIV-1 Replikation hin.

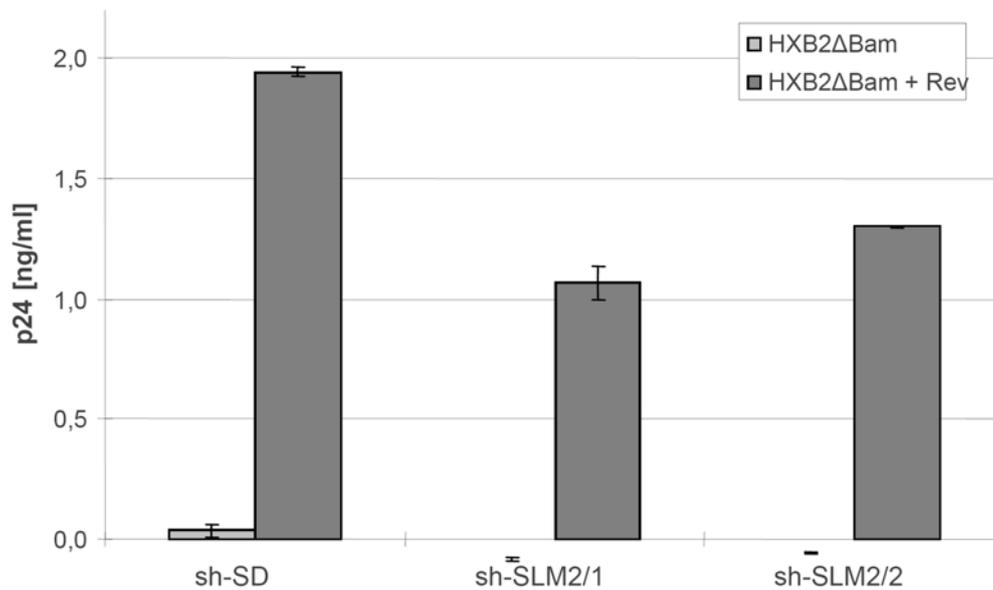


Abbildung 33: Virale Replikation in SLM2 *Knockdown* Zellen. Transiente Transfektion der stabilen HLCD4 Zellen mit pHXB2ΔBam und pRev oder Leervektor. Bestimmung der Viruspartikelproduktion im p24 Antigen ELISA.

6.2.13 Funktion von SLM2 auf die nukleozytoplasmatische Verteilung der HIV-1 mRNA und das Spleißen der viralen Transkripte

Die Funktion von SLM2 auf die virale Replikation sollte im weiteren Verlauf genauer charakterisiert werden. Hierfür wurde die Expression und nukleozytoplasmatische Verteilung der verschiedenen viralen mRNA Klassen analysiert.

Die stabilen Zelllinien HLCD4-sd-SD und HLCD4-sh-SLM2/1 wurden mit dem proviralen Konstrukt pHXB2ΔBam und pRev transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die gesamte RNA sowie die nukleäre und zytoplasmatische RNA isoliert. Die Menge an *gag*, *env* und *tat* RNA wurde in den verschiedenen Fraktionen mittels *Realtime* RT-PCR quantifiziert. Zur Auswertung wurden die Werte auf die RNA Mengen an endogene GAPDH mRNA angepasst. Die Fraktionierungskontrolle erfolgte wiederum mit einer radioaktiv-markierten U6-Sonde im *Slot* Blot.

Die Ergebnisse in Abbildung 34 zeigten, dass es insbesondere zu einer eingeschränkten zytoplasmatischen Akkumulation der *gag* mRNA in SLM2 *Knockdown* Zellen kam. Die *gag* mRNA akkumulierte stattdessen im Kern der Zellen. Insgesamt wiesen die Zellen veränderte Mengen an viralen mRNAs und somit ein verändertes Spleißmuster auf. Durch die Reduzierung der SLM2 Expression erschien die *gag* RNA nicht nur im Kern zurückgehalten, sondern auch ihr weiteres Spleißen verhindert zu werden.

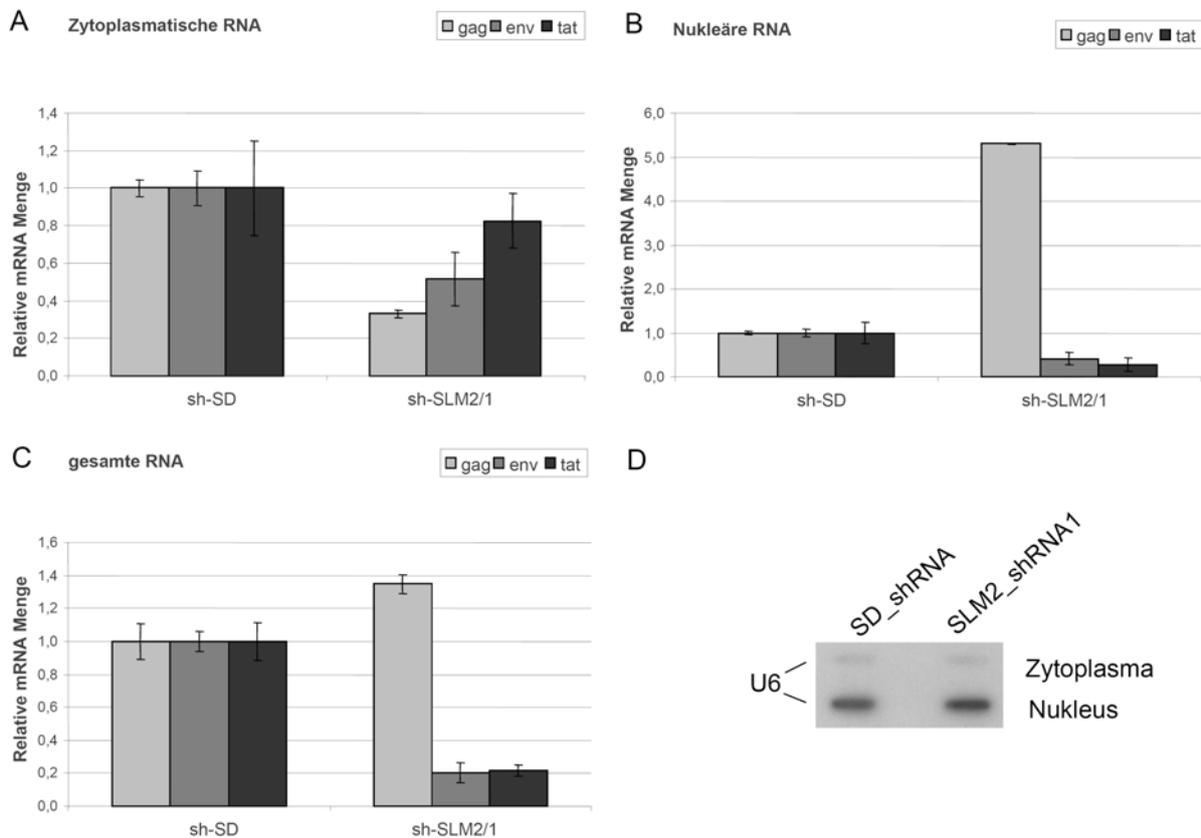


Abbildung 34: Einfluss von SLM2 auf die Verteilung und das Spleißen der viralen mRNAs. Transfektion einer HLCD4 SLM2 *Knockdown* und der Kontrollzelllinie mit pHXB2ΔBam und pRev. Fraktionierung und Isolierung der Kern- und Zytoplasma-RNA. Quantifizierung der viralen (A) *gag*, (B) *env* und (C) *tat* RNA mittels *Realtime* RT-PCR. (D) Fraktionierungskontrolle mit radioaktiver U6-Sonde im *Slot* Blot.

6.2.14 Reduktion der Sam68 und SLM2 Expression in HLCD4 Zellen

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurde vermutet, dass SLM2 die Funktion von Sam68 in HLCD4-CAT Sam68 *Knockdown* Zellen ersetzen konnte. Deshalb wurde die Expression beider Proteine mittels des lentiviralen Mission®shRNA Systems herabgesetzt. Hierfür wurde HLCD4 Zellen mit lentiviralen Partikeln für Sam68 shRNA2 und SLM2 shRNA1 transduziert. Die Vektoren vermittelten eine Puromycin- und Blasticidin-Resistenz, wodurch Sam68/SLM2 Doppel-*Knockdown* Zellen (HLCD4-sh-Sam68/2; sh-SLM2/1) selektioniert werden konnten. Zur Kontrolle und zur Resistenzvermittlung wurden einfache *Knockdown* Zellen mit Mission®shRNA Partikeln für SD shRNA mit Puromycin- bzw. Blasticidin-Resistenzgen transduziert.

Zur Verifizierung des *Knockdowns* in den vier generierten Linien wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Menge an Sam68 und SLM2 mRNA mittels *Realtime* RT-PCR und die Proteinexpression im Western Blot quantifiziert (Abbildung 35). In den Sam68/SLM2

Knockdown Linien wurde die Expression beider Gene um etwa 70% gehemmt. In Sam68 *Knockdown* Zellen war die Expression des Proteins um über 90% gehemmt. Wie vorher beobachtet, wurde durch das *Silencing* von Sam68 in diesen Zellen die Expression von SLM2 gesteigert. In SLM2 *Knockdown* Zellen kam es wiederum zu einer 50% höheren Sam68 Expression. Diese Daten legen erneut nahe, dass es durch den *Knockdown* des einen STAR Proteins zu einer Kompensation durch das andere STAR Protein kam.

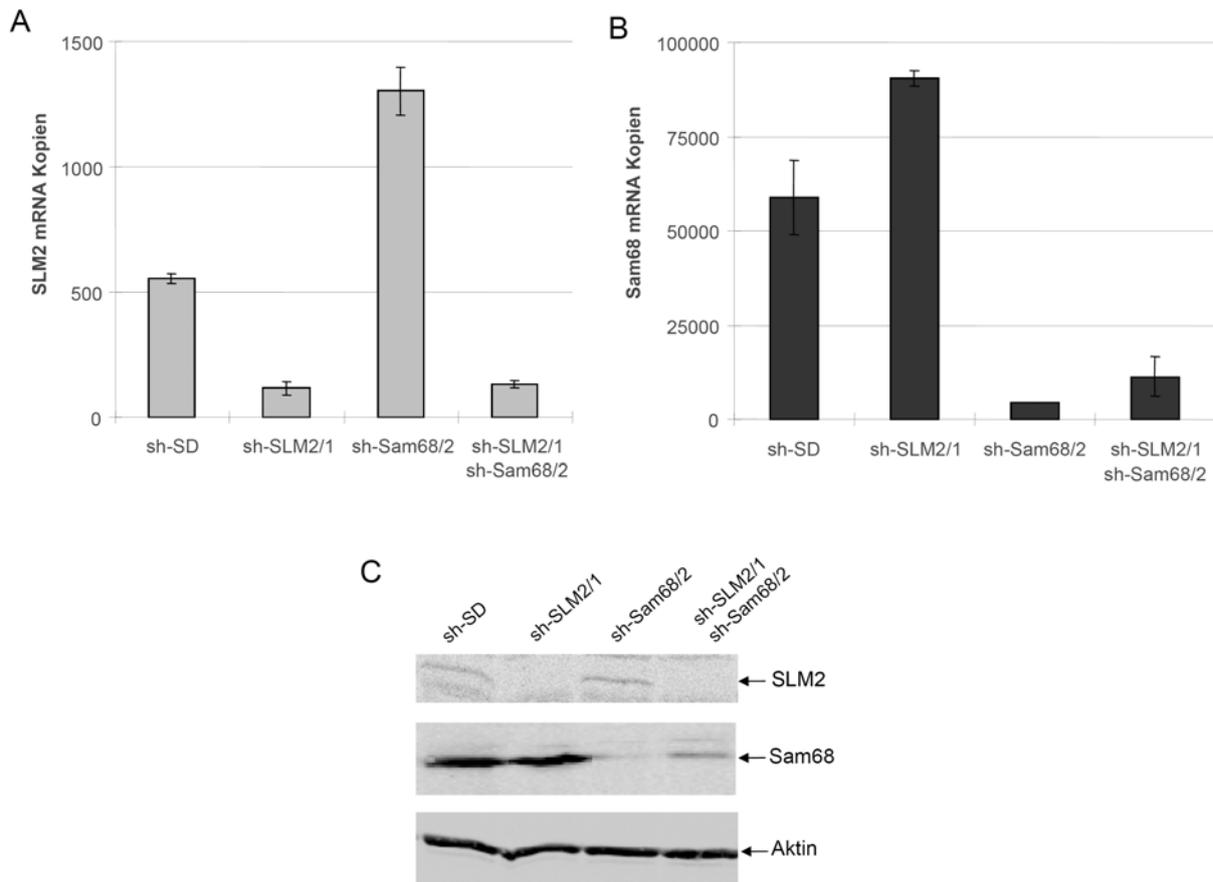


Abbildung 35: Sam68 und SLM2 Expression in Doppel-*Knockdown* Zellen. Bestimmung der Expression der RNA-bindenden Proteine. (A/B) Bestimmung der mRNA Expression mit *Realtime* RT-PCR. (A) Relative mRNA Mengen und (B) absolute mRNA Mengen. (C) Bestimmung der Proteinexpression im Western Blot.

6.2.15 Einfluss der Reduktion von Sam68 und SLM2 auf die HIV-1 Replikation im transienten Reportersystem und im Infektionsexperiment

Der Effekt durch das *Silencing* beider Proteine Sam68 und SLM2 sollte auf die HIV-1 Replikation untersucht werden. Hierbei wurden die stabilen Sam68/SLM2 Doppel-*Knockdown* Zellen im transienten Reportersystem und in Infektionsexperimenten charakterisiert.

Die *Knockdown* Zellen wurden hierfür mit dem bereits beschriebenen pHXB2ΔBam Reportersystem und dem HIV1 NL4/3Δenv Infektionssystem untersucht (Kap. 5.2.7 und 5.2.8).

Im transienten System war die Partikelproduktion sowohl in den einfachen SLM2 als auch in den Doppel-Sam68/SLM2 *Knockdown* Zellen um 40 - 45% gesenkt (Abbildung 36 A), in den Infektionsstudien um 35 – 45% (Abbildung 36 B). Hierbei wurde deutlich, dass die Reduzierung beider Proteine keinen zusätzlichen Einfluss auf die HIV-1 Replikation ausübte. Der eigentlich limitierende Faktor in den Zellen erschien daher SLM2.

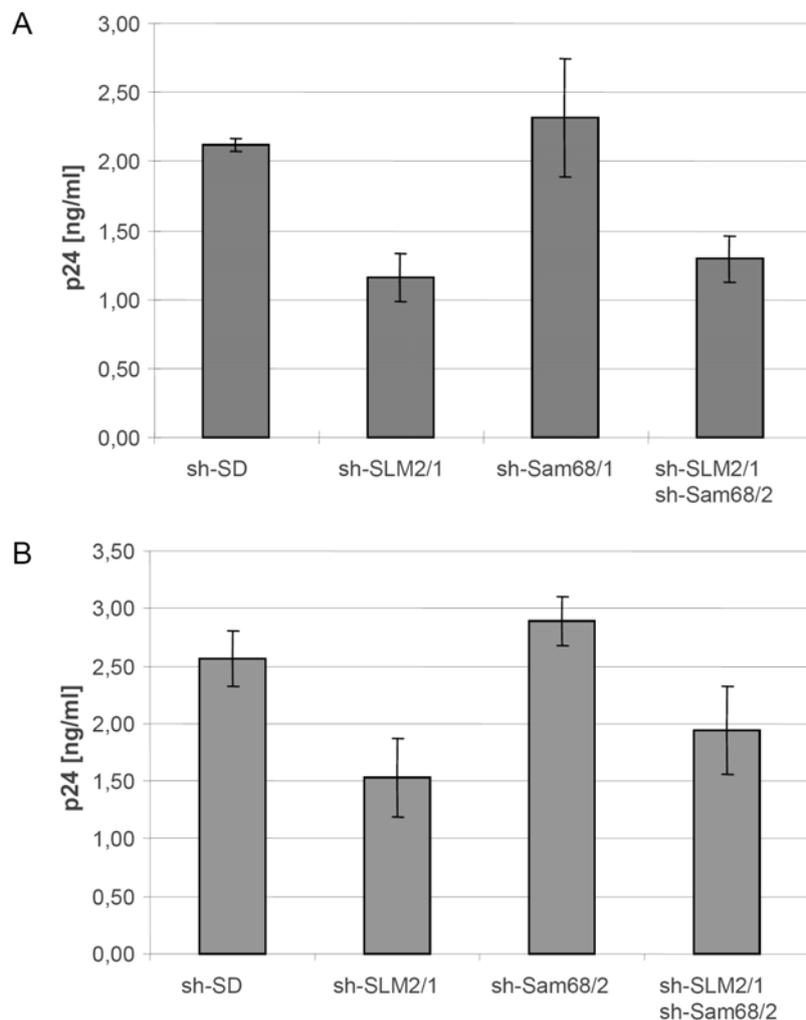


Abbildung 36: Einfluss des *Silencing* von Sam68 und SLM2 auf die HIV-1 Replikation. (A) Transiente Transfektion von stabilen HLCD4 Zellen mit pHXB2ΔBam und pRev und Bestimmung der Partikelproduktion im p24 Antigen ELISA. (B) Infektion mit HIV-1 NL4/3Δenv. Die Menge an p24 im Überstand ist dargestellt.

7 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Rev Multimerisierung und deren Funktion für die HIV-1 Transaktivierung genauer charakterisiert. Hierbei konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Multimerisierung für bestimmte Rev Eigenschaften, wie der Interaktion mit dem Kernexportrezeptor CRM1 und das *Shuttling* des Proteins, nicht benötigt wird. Desweiteren konnte demonstriert werden, dass durch die Bindung eines Monomers an die initiale Bindungsstelle des RRE die virale RNA im gleichen Maße stabilisiert wurden wie durch das multimere Rev Wildtypprotein. Insbesondere konnte die minimale Anzahl von Rev Molekülen im oligomeren RNP Komplex bestimmt werden, die für den Kernexport der ungespleißten RNA notwendig sind. Durch die Entwicklung eines spezifischen Rev Heteromultimerisierungsassays konnte hierbei die Anzahl an distinkten Rev Aktivierungsdomänen im funktionellen RNP Komplex aufgeklärt werden. Die Ergebnisse legten nahe, dass die Rev Multimerisierung primär für die Bereitstellung von mindestens zwei Aktivierungsdomänen (NES) und eventuell für die Rekrutierung weiterer zellulärer Kofaktoren in den RNP-Komplex benötigt wird.

Als potentielle Kofaktoren bei der HIV-1 Replikation wurden die RNA-bindenden Proteine Sam68 und SLM2 im murinen und humanen System charakterisiert. Hierbei konnte ein genereller Einfluss dieser Proteine auf die Expression von ungespleißter viraler mRNA festgestellt werden.

Das regulatorische HIV-1 Protein Rev spielt eine zentrale Rolle bei der komplexen Regulation der Genexpression von HIV-1 (Pollard *et al.*, 1998). Das etablierte Modell für die Rev Transaktivierung beschreibt die Expression des Proteins in der frühen Phase der HIV-1 Replikation, wodurch die Aktivierung des nukleozytoplasmatischen Exports der ungespleißten und einfach gespleißten mRNA für die späte Phase eingeleitet wird. Der exportkompetente Rev/RRE Komplex setzt sich aus der viralen RNA, Rev Homomultimeren und einer Reihe an zellulären Kofaktoren zusammen. Die minimalen Voraussetzungen für die vollständige Funktion von Rev ist die Lokalisation im Zellkern, die spezifische Bindung an das RRE, die sukzessive Multimerisierung entlang des RRE-RNA sowie die Interaktion mit Wirtsproteinen (Pollard *et al.*, 1998).

In funktionellen Studien konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die Rev Multimerisierung für die virale Genexpression absolut notwendig ist (Malim *et al.*, 1991; Mann *et al.*, 1994). Die primäre Bindung von Rev an das RRE wird hierbei nicht durch die Multimerisierung beeinflusst (Thomas *et al.*, 1998). Die bisherigen Studien konnten allerdings nicht eindeutig klären, welche speziellen Rev Eigenschaften durch die Multimerisierung betroffen sind und ob die Multimerisierung primär den RNA Kernexport oder auch andere

Rev Funktionen beeinflusst. Ebenso konnte noch nicht eindeutig die minimale Anzahl an Rev Molekülen bestimmt werden, die für die Transaktivierung notwendig sind.

Kürzlich veröffentlichte Kristallstudien gaben neue Einblicke in die Struktur von Rev und die Interaktionsflächen für die Multimerisierung (DiMattia *et al.*, 2010; Daugherty *et al.*, 2010). Wie in früheren Strukturmodellen (Auer *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1997) konnten diese Kristallisationsdaten zeigen, dass der Aminoterminus von Rev eine *Helix-Loop-Helix* Struktur ausbildet. Hierdurch kommt es zur parallelen Ausrichtung der α -Helices und somit der Multimerisierungsdomänen (Abbildung 6). Neuere biochemische Daten und diese Kristallisationsstudien führten zu einem Modell mit zwei getrennten Interaktionsflächen (Jain *et al.*, 2001; DiMattia *et al.*, 2010). Die beiden α -Helices bilden hierbei eine planare Ebene mit zwei Grenzflächen. Unpolare Aminosäuren bilden hydrophobe Oberflächen, die einerseits zur Stabilisierung des Helix-Loop-Helix Motivs führen und andererseits zwei distinkte Rev Interaktionsflächen auf der planaren Struktur ausbilden.

Es wurde von Daugherty *et al.* (2010) ein Modell für die Multimerisierung erstellt. Hierbei findet die Dimerisierung von Rev kooperativ mit der RRE-RNA Bindung statt. Initial bindet das erste Rev Monomer an das SLIIB Motiv des RRE. Erst danach kommt es zur Interaktion mit einem weiteren Rev Monomer. Dieses bindet sowohl an die exponierte Dimerisierungsstelle des ersten SLIIB-gebundenen Rev Moleküls als auch an eine sekundäre RNA Bindungsstelle innerhalb des RRE. Für die Bildung höherer Komplexe ist die zweite hydrophobe Grenzfläche verantwortlich. Diese Interaktionsfläche verursacht zudem die RRE-unabhängige Aggregation von Rev in Lösung (Nalin *et al.*, 1990; Wingfield *et al.*, 1991). Durch die Kristallisationsstudien wurde ein Modell aufgestellt, bei dem es die durch die Bindung der Rev Oligomere an die virale RNA zu einer Ausrichtung der carboxyterminalen Aktivierungsdomänen kommt. Dadurch werden die Aktivierungsdomänen auf einer Seite präsentiert und es kommt zur Interaktion mit den Faktoren der zellulären Kernexportmaschinerie (Daugherty *et al.*, 2010). Ein funktioneller Mechanismus bei der Bildung eines Dimers und der weiteren Assemblierung zu Rev Multimeren konnten anhand der Struktur jedoch nicht formuliert werden.

7.1 Charakterisierung der Rev Multimerisierung

Die am besten beschriebenen Multimerisierungs-defizienten Mutanten in der Literatur sind RevM4, RevM7 und RevSLT40 (Malim *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1998). RevSLT40 ist hierbei die einzige soweit beschriebene Mutante, die weder Homodimere mit sich selbst noch Heterodimere mit RevWT oder anderen Rev Mutanten *in vitro* und *in vivo* bilden kann. Hierdurch besitzt sie einen transdominanten Phänotyp in transienten HIV-1

Transfektionsstudien. Kürzlich konnte dies auch in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe in FACS-basierten FRET Studien in lebenden Zellen gezeigt werden (Banning *et al.*, 2010).

Die Charakterisierung der RevSLT40 Mutante erbrachte in dieser Arbeit neue Erkenntnisse über den funktionellen Ablauf der Rev Multimerisierung und die Transaktivierung. Durch die Untersuchung des *Shuttling* von Rev in Heterokaryonstudien wurde deutlich, dass die Multimerisierung keine Rolle bei der Interaktion von Rev mit CRM1 spielt. Die RevSLT40 Monomere konnten zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln und dies geschah über den CRM1 abhängigen Transport des Proteins. Unterstützend dazu zeigten *in vitro* Studien einer externen Arbeitsgruppe, dass bereits ein gereinigtes Rev-NES Peptid einen Komplex mit CRM1 und RanGTP bilden kann (Fornerod *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang lokalisierten RevSLT40 Monomere wie RevWT im Zellkern und in den Nukleoli, wodurch auch ein Einfluss der Multimerisierung auf den Kernimport ausgeschlossen werden konnte. Es wurde bereits gezeigt, dass RevSLT40 Monomere in der Lage waren, an den SLIIB als primäre Bindungsstelle des RREs *in vivo* und *in vitro* zu binden (Thomas *et al.*, 1998). Ungeklärt blieb, ob für die beschriebene Stabilisierung der *gag* RNA die Bindung eines Monomers ausreichte (Felber *et al.*, 1989; Malim *et al.*, 1993). Die vorliegende Arbeit zeigte, dass es in Gegenwart von RevSLT40 Monomeren und Rev Wildtyp zu keiner Veränderung der Halbwertszeit der *gag* RNA kam. Somit spielte die Assemblierung von weiteren Rev Molekülen entlang des RRE keinen weiteren Einfluss auf die Stabilität der *gag* Transkripte. Durch die Analyse der Verteilung der viralen mRNA Klassen in den Zellen konnte gezeigt werden, dass biologisch inaktive RevSLT40 Monomere nicht in der Lage waren, den Export von ungespleißter und einfach-gespleißter viraler mRNA zu vermitteln. Allerdings führte die induzierte Dimerisierung von RevSLT40 über den GCN4 Leuzin Zipper sowie über chemisch-induzierbare Homodimere offensichtlich zur Rekonstitution der biologischen Rev Aktivität im proviralen Kontext. Bei den ZipRevSLT40 Homodimeren kam es wie beim Rev Wildtypprotein zur Akkumulation von *gag* und *env* RNA im Zytoplasma. Somit erscheinen zwei Rev Moleküle im RNP Komplex ausreichend, damit die virale ungespleißte RNA effektiv ins Zytoplasma transportiert wird. Die Homodimere besaßen hierbei die Eigenschaft, im Kern zu lokalisieren, RNA zu binden und mit CRM-1 zu interagieren. Die Rekonstitution der Rev Aktivität durch die ZipRevSLT40 Mutante von nur 40 – 60% könnte auf die Lokalisation des Proteins zurückzuführen sein. Neben der Lokalisierung im Zellkern und in den Nukleoli kam es zur zytoplasmatischen Anreicherung des Proteins. Hierbei ist von Bedeutung, dass der RNP Komplex im Zytoplasma dissoziiert, damit die virale RNA für die Translation freigegeben wird (Pollard *et al.*, 1998). Anzunehmen ist, dass die zytoplasmatische Fraktion der ZipRevSLT40 Dimere weiter an die virale RNA gebunden blieb, wodurch die Translationsinitiation teilweise blockiert werden könnte.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit deutlich, dass die Bildung eines Rev Dimers für die biologische Aktivität ausreichend erscheint. Andere Arbeitsgruppen konnten bisher nur vermuten, dass für einen funktionellen RNP Komplex zwei oder drei Rev Moleküle notwendig seien (Huang *et al.*, 1991; Malim *et al.*, 1991; Daly *et al.*, 1993b). Weitere Studien haben gezeigt, dass im Rev Reportersystem ein minimales 88 bp verkürztes RRE, das sich nur aus dem SLIIA und B zusammensetzte, für die Rev Funktion *in vivo* ausreichte. In diesen Studien funktionierte allerdings erst eine Tandemkopie der verkürzten RRE-Sequenz so effizient wie ein RRE mit voller Länge (Huang *et al.*, 1991). Die genaue Anzahl an gebundenen Rev Molekülen und somit die minimale Anzahl für die Rev Transaktivierung konnte auch hier nicht quantifiziert werden, da nicht eindeutig war, wieviele Rev Moleküle an das verkürzte RRE binden konnten.

Durch die spezifischen Rev Heterodimerisierungsstudien mit der Mutante RevSLT40M10 erwies sich, dass nur ein Rev Dimer mit zwei funktionellen Aktivierungsdomänen die Genexpression von Strukturproteinen aktivieren konnte. Durch die Doppelmutation in RevSLT40M10 wurde die Bindung der Mutante an den SLIIB innerhalb des RRE der viralen mRNA nicht beeinflusst. Dass mehrere funktionelle Aktivierungsdomänen für den RNP-Komplex notwendig sind, wurde schon in vorherigen Studien mit chimären MS2/Rev Fusionsproteinen angedeutet (Mcdonald *et al.*, 1992). Die genaue Anzahl konnte in diesen Studien allerdings nicht ermittelt werden und wurde auf drei bis vier Aktivierungsdomänen geschätzt.

Dies bedeutete, dass die Rev Dimerisierung über den strukturierten Aminoterminus des Proteins stattfinden muss, damit carboxyterminal zwei Aktivierungsdomänen bereitstehen, über die eine Interaktion mit der zellulären Exportmaschinerie stattfindet. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass das Rev-NES zwar an CRM1 bindet, die Affinität dabei allerdings sehr gering ist (Askjaer *et al.*, 1999). Askjaer *et al.* vermuteten, dass erst durch die Rev Multimerisierung am RRE eine ausreichende lokale Konzentration entsteht, die der Rev/CRM1 Interaktion genügend Stabilität verleiht (Askjaer *et al.*, 1999). Die Strukturdaten belegten, dass bei der Interaktion ein Rev-NES in einer hydrophoben Tasche von CRM1 bindet (Guttler *et al.*, 2010). Eine Stabilisierung durch die Interaktion von zwei NES mit einem CRM1 kann deshalb ausgeschlossen werden. Eine plausible Erklärung hierfür ist, dass über zwei funktionelle Kernexportsignale (NES) auch die Interaktion mit zwei CRM1 Molekülen stattfindet. Sterisch ist die Rekrutierung von zwei CRM1 Molekülen in den Rev-RNA Komplex möglich (Daugherty *et al.*, 2010). Desweiteren belegen *in vitro* Studien, dass es sich bei der Assemblierung des RNP Komplexes aus Rev-NES, CRM1 und RanGTP um einen kooperative Prozess handelt (Fornerod 1997). Hierbei wurde gezeigt, dass durch

CRM1/RanGTP die Rev Multimerisierung verstärkt wird und auf der anderen Seite das Rev-NES den CRM1/RanGTP Komplex stabilisiert. Dies legt nahe, dass es sich bei der RRE Bindung und Dimerisierung, sowie bei der Interaktion von CRM1/RanGTP mit dem Rev/RNA Komplex insgesamt um ein kooperatives Ereignis handelt. Es ist zu vermuten, dass dieser Prozess durch die Multimerisierung von Rev eingeleitet wird, wodurch es zur schnellen Kinetik bei der Assemblierung des RNP Komplexes und zum unverzüglichen Export ins Zytoplasma kommt.

Interessanterweise wurde bereits beschrieben, dass neben dem NES (As 73-83) auch der komplette Carboxyterminus für die effiziente Interaktion von Rev und CRM1 bzw. die Rev Transaktivierung notwendig ist (Hakata *et al.*, 2002). Diese Regionen sind für die direkte Bindung von Rev an CRM1 nicht erforderlich (Askjaer *et al.*, 1998; Guttler *et al.*, 2010). Allerdings bieten sie Interaktionsstellen für die Wechselwirkung mit weiteren zellulären Rev Kofaktoren. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass durch humanes eIF5A eine Stabilisierung des Komplexes aus Rev-NES, CRM1 und RanGTP stattfindet (Hofmann *et al.*, 2001). Vorherige Studien bezweifeln die Notwendigkeit von weiteren Faktoren neben CRM1 beim Rev-vermittelten Transport von ungespleißter RNA (Yi *et al.*, 2002). Die Daten basierten allerdings auf Interaktionsstudien in Retikulozytenextrakten, in denen eine Vielzahl zellulärer Faktoren angereichert ist.

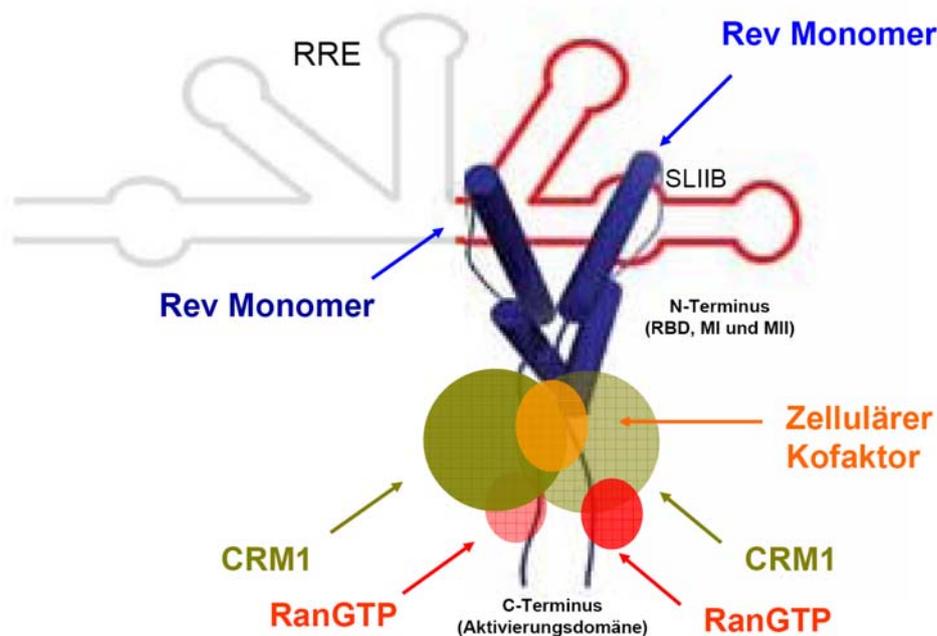


Abbildung 37: Modell eines funktionellen RNP Komplexes. Der Komplex besteht aus der viralen RNA, einem Rev Dimer mit jeweils einem gebundenen CRM1 und RanGTP. Weitere zelluläre Faktoren müssen in den Komplex rekrutiert werden, damit der Kernexport stattfinden kann. Die Rev Monomere sind in ihrer schematischen Sekundärstruktur, die durch Kristallisationsstudien geklärt wurde, dargestellt (modifiziert aus Daugherty *et al.*, 2010).

Die Notwendigkeit des kompletten Carboxyterminus für die Rev Aktivität deutet auf die Existenz weiterer Wirtsproteine hin, die an der Bildung eines stabilen RNP Komplexes für den nukleozytoplasmatischen Transport beteiligt sind. Hierbei könnten zelluläre Faktoren, z.B. als *Scaffold* Proteine, den wenig strukturierten Carboxyterminus für die Interaktion mit zwei CRM1 Exportrezeptoren zugänglich machen. Die nähere Analyse weiterer potentieller Rev Kofaktoren bildet somit die Voraussetzung, den Mechanismus der Rev Transaktivierung in seinen Einzelheiten besser zu verstehen. In Abbildung 37 ist das Modell des funktionellen RNP Komplexes mit zwei Rev Molekülen dargestellt.

7.2 Charakterisierung der Funktion von Sam68 und SLM2 bei der HIV Replikation

Mehrere putative Kofaktoren, die einen potentiellen Einfluss auf die Rev-vermittelte Genexpression besitzen, wurden bereits beschrieben (Suhasini *et al.*, 2009; Groom *et al.*, 2009a). Häufig ist allerdings nicht genau geklärt, bei welchem Schritt im Rahmen der Rev Transaktivierung diese Faktoren eine Rolle spielen. Auch fehlen teilweise notwendige Kontrollexperimente, die näheren Aufschluss geben, ob es sich hierbei um einen Rev/RRE spezifischen Effekt handelt oder der Faktor einen generellen Einfluss auf die Expression von beispielsweise ungespleißter retroviraler RNA ausübt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das zelluläre RNA-bindende Protein Sam68 insbesondere in Mauszellen die *gag* Genexpression steigern konnte und daraus eine erhöhte Virionenproduktion resultierte. Die exogene Überexpression von Sam68 ermöglichte im murinen System eine effektiven Gag Prozessierung und Virionenassemblierung, die ansonsten nur sehr eingeschränkt beobachtet werden kann (Mariani *et al.*, 2000). Es zeigte sich allerdings, dass Sam68 keinen spezifischen Einfluss auf die Rev/RRE Funktion ausübte, sondern generell die Expression von ungespleißter *gag* mRNA unabhängig vom viralen *cis*-aktiven Kernexportelement steigerte. Hierdurch wurden vorherige Studien widerlegt, die eine Rev/RRE-spezifische Interaktion von Sam68 beschrieben und Sam68 sogar als funktionelles Homolog von Rev charakterisierten (Reddy *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002a). Die Ergebnisse dieser Arbeit standen stärker mit Studien im Einklang, die eine allgemeine Funktion von Sam68 auf ungespleißte *gag* RNA beschrieben (Coyle *et al.*, 2003). Sam68 zeigte in Mauszellen keinen direkten Effekt auf die posttranslationale Prozessierung von HIV-1 Gag p55, sondern schien insgesamt die Expression der HIV-1 Strukturproteine zu verstärken. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass Sam68 auch die Expression eines Rev-abhängigen CAT Reporters in murinen Zellen steigerte, bei dem die posttranslationale Prozessierung des Reportergens keine Rolle spielte. In der Analyse der Gag p55 und p24

Expression in Western Blot Analysen mit den GPV Konstrukten wurde dies experimentell nicht deutlich, da hierbei nicht unabhängig zwischen Gag Expressionsstärke und Prozessierung unterschieden werden konnte.

Insgesamt zeigte sich, dass die mangelhafte Prozessierung und Partikelproduktion von Rev-abhängigen *gag* Transkripten in murinen Zellen durch die Sam68 induzierte Expressionssteigerung von Gag umgangen werden konnte. Diese Beobachtung wird von anderen Studien unterstützt, die eine Gag Schwellenkonzentration in der Zelle beschreiben, die überschritten werden muss, damit die Prozessierung von Gag an der Zellmembran stattfindet (Perez-Caballero *et al.*, 2004; Hatzioannou *et al.*, 2005). Mechanistisch wird eine inhibierende Funktion des Matrixproteins auf den Myristinsäurerest beschrieben, der notwendig für die Interaktion von Gag mit der Zellmembran und damit für die Viruspartikelproduktion ist (Bryant and Ratner, 1990). Hierbei besitzt das Matrixprotein eine globuläre Kopfdomäne, welche die Myristinsäuregruppe verdeckt (Tang *et al.*, 2004; Resh, 2004). Es wird angenommen, dass ab einer gewissen Anreicherung von Gag im Zytoplasma eine kooperative Gag Multimerisierung stattfindet, wodurch die Myristinsäurereste exponiert werden und es zur Wechselwirkung mit der Zellmembran kommt (Perez-Caballero *et al.*, 2004).

Eine grundsätzliche Fehlfunktion des Sam68 Proteins in Mauszellen hinsichtlich der HIV-Replikation konnte ausgeschlossen werden, da auch die ektopische Expression von murinem Sam68, welches hierfür von NIH3T3 Fibroblasten cDNA amplifiziert wurde, die Gag Expression steigerte. Auch eine mangelhafte Expression von Sam68 in den Mausfibroblasten wurde nicht beobachtet.

Die Sam68 induzierte Steigerung der Gag Expression war ebensowenig auf murine NIH3T3 Zellen beschränkt, sondern wurde auch in humanen HeLa Zellen beobachtet. Insgesamt schien Sam68 somit im murinen System keinen zusätzlichen Restriktionsfaktor bei der HIV-1 Replikation darzustellen, obwohl dessen ektopische Expression die Blockade auf Ebene der Virionenassemblierung in murinen Zellen herstellen konnte.

Die murinen Zellen wiesen allgemein einen sogenannten *Leaking* Effekt beim Export der *gag* mRNA mit den modifizierten GPV HIV Reportern auf, der in humanen HeLa Zellen nicht in diesem Umfang beobachtet wurde. Für die Charakterisierung der Sam68 Funktion, besonders bei der Untersuchung des viralen RNA Transports, war deshalb das murine System nicht geeignet. Zur Aufklärung der Rolle von Sam68 bei der viralen Replikation sollten die Studien in einem permissiven humanen System durchgeführt werden. Hierzu wurden HeLa Zellen ausgewählt, die aufgrund ihrer Expression des CD4 Rezeptormoleküls mit HIV-1 infiziert werden konnten. Dadurch sollten fehlerhafte Rückschlüsse durch artifizielle Reporter vermieden werden.

Die Sam68 RNAi Studien in HIV-permissiven Epithelzellen und in Lymphozyten zeigten im Widerspruch zu zwei vorherigen Studien (Li *et al.*, 2002a; Modem *et al.*, 2005), die auf *Antisense* RNA und vektorbasierte siRNA beruhten, keinen Effekt auf die HIV-1 Replikation. Widersprüche zwischen RNAi Experimenten lassen sich oft mit sogenannte *Off-Target* Effekten erklären (Jackson 2003; Okino 2007). Hierbei führt die Expression einer shRNA oder die Transfektion von siRNA zur Regulation anderer unspezifischer Gene. Dadurch entstehen Effekte, die nicht speziell durch den *Knockdown* des Zielproteins hervorgerufen wurden. Besonders anfällig sind hierfür Experimente mit *Antisense* RNA, wie von Li *et al.* (2002) verwendet, da diese aufgrund ihrer Länge besonders häufig unspezifisch mit anderen zellulären mRNAs interagieren kann. Aktuelle RNAi Studien werden deshalb prinzipiell mit zwei verschiedenen siRNA oder shRNA Sequenzen durchgeführt. Entsprechend wurden sowohl für die RNAi Experimente in dieser Arbeit, sowie für die Versuche von Modem *et al.* (2005), jeweils zwei unabhängigen shRNAs verwendet. Dadurch sollten die *Off-Target* Effekte in beiden Studien minimiert sein. Die Widersprüche lassen sich noch durch die verschiedenen verwendeten Zelllinien in den Sam68 *Knockdown* Experimenten erklären. Hierbei untersuchten Modem *et al.* (2005) den Effekt von Sam68 auf HIV allein in HeLa Zellen, wohingegen in den vorliegenden Studien HLCD4 und bereits infizierten T-Lymphozyten, die konstitutiv HI-Viruspartikel produzierten, analysiert wurden.

Unter Berücksichtigung der zuvor beschriebenen Rolle von Sam68 bei der HIV-1 Replikation (Li *et al.*, 2002a; Modem *et al.*, 2005) wurde im Laufe dieser Arbeit erwogen, dass der Sam68 *Knockdown* durch funktionsverwandte RNA-bindende Proteinen in HLCD4 Zellen kompensiert wurde. Ähnliche Phänomene wurden bereits in *Knockout* Mäusen im zellulären Kontext beobachtet, wobei beispielsweise das Ausschalten einer Komponente eines multimeren cAMP-abhängigen Holoenzym zur gesteigerten Expression einer anderen Isoform und somit zur Kompensation der Funktion bei der Signaltransduktion führte (Amieux *et al.*, 1997). Untersuchungen ergaben, dass Sam68 im Zellkern mit zellulärer RNA und einer Vielzahl zusätzlicher Proteine assoziiert ist (Huot *et al.*, 2009). Zwei dieser Faktoren sind die beiden Sam68-ähnlichen Proteine SLM1 und SLM2. Neben weiteren RNA-bindenden Mitgliedern gehören Sam68, SLM1 und SLM2 zur Familie der STAR (*Signal Transduction and Activation of RNA*) Proteine. Es wurde beschrieben, dass Sam68 und SLM2 miteinander Heteromultimere bilden können (Di Fruscio *et al.*, 1999) und in sogenannten Sam68/SLM2 *Nuclear Bodies* lokalisiert sind (Chen *et al.*, 1999). Wie Sam68 induziert SLM1 und SLM2 die Gag Expression, ausgehend sowohl von Rev-abhängigen als auch von Rev-unabhängigen Transkripten (Soros *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2002).

In semiquantitativen RT-PCR Analysen konnte im Rahmen dieser Arbeit keine SLM1 mRNA in HLCD4 Epithelzellen detektiert werden. SLM2 dagegen wurde in diesen Zellen exprimiert und die Expression war in *Sam68 Knockdown* Zellen, im Vergleich zu Kontrollzellen, um mehr als das Doppelte erhöht. Dies unterstützte die vorherige Annahme, dass das *Sam68 Silencing* zu einer erhöhten SLM2 Expression führte, und dadurch *Sam68* funktionell ersetzt werden konnte. SLM2 stellte somit einen weiteren potentiellen zellulären Kofaktor der HIV Replikation dar. Der *Knockdown* von SLM2 führte zu Reduktion der Viruspartikelproduktion in Transfektionsstudien mit proviraler HIV DNA oder in Infektionsexperimenten mit VSV-G pseudotypisierten Viren. Die reduzierte Viruspartikelproduktion konnte auf einen ineffizienten Kernexport der *gag* RNA zurückgeführt werden. Andere Studien lieferten bereits erste Hinweise, dass durch die Expression von SLM2 die Rev-abhängige Genexpression und insbesondere der Kernexport der Rev-abhängigen RNA beeinflusst wird (Reddy *et al.*, 2002). Allerdings wurde auch gezeigt, dass SLM2 einen Einfluss auf die CTE Funktion ausübt, der nicht allein durch den gesteigerten mRNA Export zu erklären war, sondern einen Effekt auf die Translation durch *Sam68* und SLM2 beschrieb (Coyle *et al.*, 2003).

Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass neben dem Transport auch das Spleißen der viralen mRNA durch den SLM2 *Knockdown* beeinflusst wird. Hierbei kam es zu einer Akkumulation von ungespleißter *gag* RNA im Zellkern, die nicht weiter gespleißt wurde. Dadurch war die Menge an *env* und *tat* mRNA in den SLM2 *Knockdown* Zellen insgesamt stark reduziert. In vorherigen Studien konnte auf zellulärer Ebene demonstriert werden, dass SLM2 wie *Sam68* mit dem Spleißosom assoziiert ist (Stoss *et al.*, 2001). Im HIV-1 Kontext wurde zudem beschrieben, dass SLM2 und *Sam68* die 3' Prozessierung der ungespleißten viralen RNA unterstützen (McLaren and Cochrane, 2009). In derselben Studie wurde gezeigt, dass endogenes *Sam68* an die HIV-1 mRNA bindet und hierbei vorzugsweise mit ungespleißter RNA assoziiert. Hierbei bleibt festzuhalten, dass diese Bindung unabhängig von Rev und dem RRE erfolgte. Eine Bindung von SLM2 an die virale mRNA und somit ein direkter Einfluss scheint somit ebenso möglich. Insbesondere würde dies erklären, dass der Einfluss der STAR Proteine auf die Gag Expression unabhängig vom viralen *cis*-aktiven RNA Exportelement beobachtet wurde, was auch in der vorliegenden Arbeit deutlich wurde (Hong *et al.*, 2002).

Innerhalb des Replikationszyklus von HIV wird funktionell zwischen dem Spleißen der viralen mRNA in der frühen Phase und dem Rev-abhängigen Kernexport der ungespleißten mRNA in der späten Phase unterschieden (Kim *et al.*, 1989). Der Einfluss von SLM2 sowohl auf das Spleißen und den Transport der viralen RNA spricht für eine sehr frühe Funktion des Proteins im Verlauf der viralen Genexpression. Eine Bedeutung von SLM2 und *Sam68* bei

der 3'-End Prozessierung der viralen pre-mRNA würde hierbei die Fülle an beschriebenen Funktionen in der Literatur erklären (Reddy *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002a; Coyle *et al.*, 2003; McLaren *et al.*, 2004). Ein Ereignis, welches sowohl die weitere Prozessierung der mRNA im Kern, den RNA Export sowie einen Effekt auf die Translation von Gag beschreibt, ist die Abspaltung und die darauffolgende Polyadenylierung des 3'-Endes der neuentstehenden pre-mRNA. Dies ist für den nukleozytoplasmatischen Transport von mRNA notwendig und schützt diese dem Abbau durch das Exosom im Zellkern (Rodriguez *et al.*, 2004). Die Länge des Poly(A) Terminus bestimmt auch die Verweildauer im Polysom und dadurch die Proteinexpression (Fromont-Racine *et al.*, 2003). Bei den meisten RNAs kommt es während der Translation zur progressiven Verkürzung des Poly(A) Endes, wodurch die deadenylierte mRNA im Zytoplasma degradiert wird.

Überraschenderweise führte der gleichzeitige *Knockdown* von SLM2 und Sam68 zu keiner weiteren Hemmung der HIV-1 Replikation. Als limitierender Faktor der Hemmung der viralen Replikation erwies sich deshalb nur SLM2. Allerdings wurde Sam68 generell stärker in humanen Epithelzellen exprimiert als SLM2. Beim Vergleich der absoluten Restexpression von Sam68 und SLM2 in den entsprechenden *Knockdown* Zellen wurde deutlich, dass wesentlich mehr Sam68 in Sam68 *Knockdown* Zellen vorhanden war, als SLM2 in entsprechenden *Knockdown* Zellen. Ob die verbliebene Menge an Sam68 in den Zellen somit ausreichte, oder die Funktion des Proteins *per se* durch andere verwandte Proteine wie SLM2 ersetzt werden konnte, kann nur durch den *Knockout* von Sam68 geklärt werden. Insgesamt ließ sich aber feststellen, dass die Reduktion der Sam68 Expression um 95% keinen Einfluss auf die HIV-1 Replikation zeigte. Dadurch stellt Sam68 allein für neue Therapien keinen vielversprechenden Angriffspunkt dar. Dies wurde auch bei der Untersuchung der T-Lymphozytenzelllinie ACH-2 deutlich, wobei der Sam68 *Knockdown* ebenfalls ohne Effekt auf die HIV-1 Replikation blieb.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für einen potentiellen heteromultimeren Sam68/SLM2 Komplex, der während der HIV-1 Replikation funktionell eine Rolle spielt. Verschiedene unabhängige Studien sprechen dafür, dass Sam68, SLM1 und SLM2 in der Summe eine distinkte Funktion bei der Virusreplikation ausüben. Diese konnten insgesamt zeigen, dass die transiente Expression von Sam68, SLM1 und SLM2 die Gag Genexpression und Virusproduktion deutlich steigern. Dies wurde besonders in Zellen wie Astrozyten (Li *et al.*, 2002b) und den in dieser Arbeit verwendeten murinen Fibroblasten beobachtet, in denen das Virus unter normalen Bedingungen nur sehr ineffizient repliziert. In der Literatur wird zudem beschrieben, dass die Deletion des Carboxyterminus von Sam68 einen transdominanten Phänotyp auf die HIV-1 Replikation ausübt. Im Gegensatz zum kernständigen Wildtypprotein

lokalisiert die Sam68 Δ C Mutante im Zytoplasma und hält die virale mRNA in perinukleären Regionen zurück (Reddy *et al.*, 1999; Henao-Mejia *et al.*, 2009). Dies führt zu einer Retention der RNA und wahrscheinlich zu deren Abbau. Diese Mutante scheint somit die virale RNA beim Export ins Zytoplasma abzufangen, beeinflusst allerdings nicht direkt die Funktion der STAR Proteine im Zellkern. Die Ergebnisse dieser Arbeit und vorherige Studien (McLaren *et al.*, 2009) legen nahe, dass die Proteine der Sam68 Familie ihre entscheidende Funktion während der HIV-1 Replikation bei der 3'-End Prozessierung der viralen RNA ausüben. Es handelt sich wahrscheinlich um einen multimeren Komplex aus STAR Proteinen, deren Komponenten redundante Funktionen ausüben und dadurch untereinander ersetzt werden können. Um diesen Komplex für therapeutische Zwecke zu inhibieren, müsste als Angriffspunkt eine gemeinsame Eigenschaft der STAR Proteine genutzt werden, um die Replikation des HI-Virus effizient zu unterdrücken. Das Modell für die Rolle von Sam68 und SLM2 bei der viralen Replikation ist in der Abbildung 38 zusammengefasst.

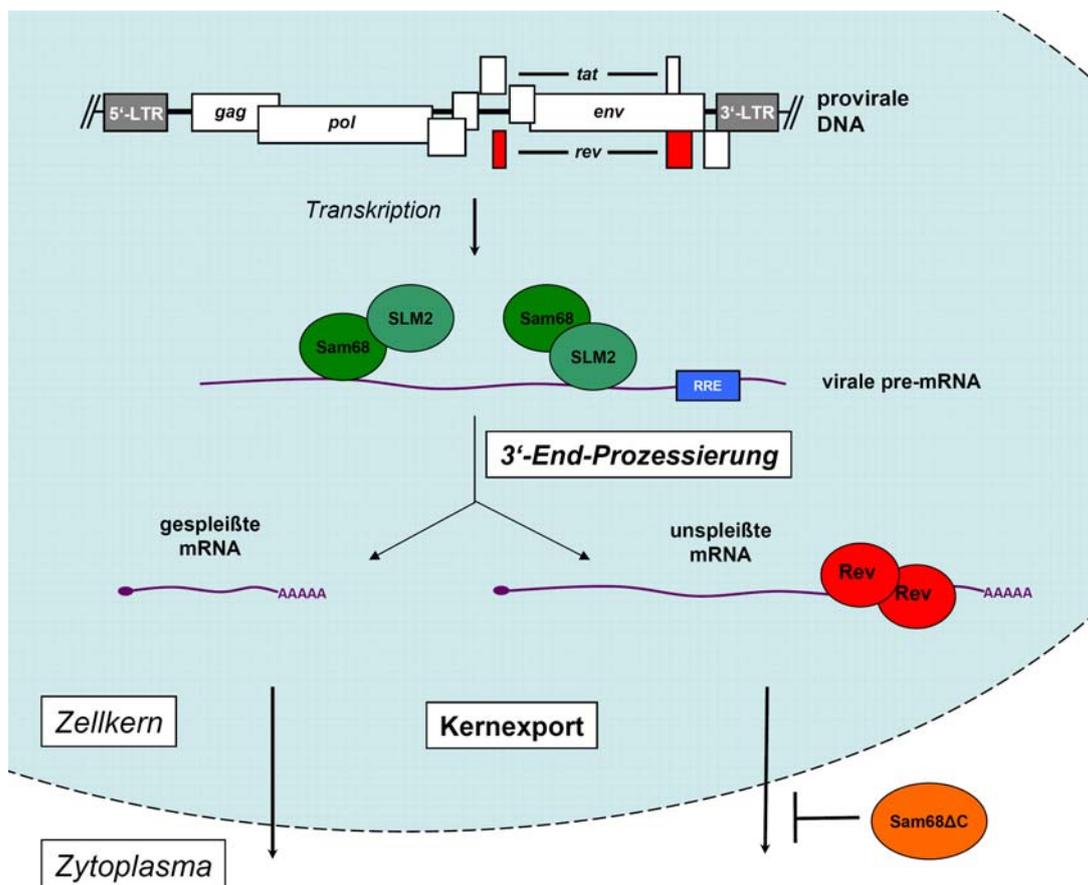


Abbildung 38: Modell für die Rolle von Sam68 und SLM2 bei der HIV-1 Virusreplikation. Sam68 und SLM2 fördern die 3'-End Prozessierung der viralen mRNA und beeinflussen somit weitere *downstream* Ereignisse bei der RNA Prozessierung und -Expression. Die transdominante Mutante Sam68 Δ C hält die ungespleißte virale mRNA im Zytoplasma in perinukleären Regionen zurück.

8 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
As	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CA	Kapsid Protein (p24) von HIV-1
CFP	<i>Cyan Fluorescence Protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMV-IE	<i>Cytomegalovirus Immediate Early Promoter</i>
CRM1	<i>Chromosome Region Maintenance 1</i> ; Kernexportrezeptor
CRS	<i>Cis-Acting Repressive Sequence</i>
CTE	<i>Constitutive Transport Element</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
Env, <i>env</i> <i>et al.</i>	<i>Envelope</i> ; Hüllprotein und kodierendes Gen bzw. RNA von HIV-1 <i>et alii</i>
FRET	Förster Resonanz Energietransfer
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
Gag, <i>gag</i>	<i>Group specific Antigen</i> ; Strukturproteine und kodierendes Gen bzw. RNA von HIV-1
h	Stunde
HAART	<i>Highly Active Anti Retroviral Therapy</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HTLV	Humanes T-lymphotropes Leukämievirus
HXB2	proviraler Klon von HIV-1
IN	Integrase
INS	<i>Instability Sequence</i>
k	Kilo
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LMB	Leptomycin B
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	Molar
MI	Multimerisierungsregion I
MII	Multimerisierungsregion II
MA	Matrix
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaAC	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nukleokapsid
Nef, <i>nef</i>	Nef Protein und kodierendes Gen bzw. RNA von HIV-1
NES	<i>Nuclear Export Signal</i> ; Kernexportsignal
NL4-3	HIV-1 Isolat
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i> ; Kernimportsignal
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NPC	<i>Nuclear Pore Complex</i> ; Kernporenkomplex
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i> ; offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
RNP	Ribonukleoprotein
Pol, <i>pol</i>	HIV-1 Enzyme und kodierendes Gen und RNA von HIV-1
PR	Protease
RBD	<i>RNA Binding Domain</i> , RNA Bindungsdomäne
Rev	<i>Regulator of Expression of virion</i>
RNA	Ribonukleinsäure

RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
RRE	<i>Rev Response Element</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
Sam68	<i>Src associated substrate in mitosis of 68kDa</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SL	<i>Stem-Loop</i>
SLM1/2	<i>Sam68-like mammalian protein 1 and 2</i>
STAR	<i>Signal Transduction and Activation of RNA</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
t	Zeit
Tat	virales Transaktivatorprotein
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembran Glykoprotein (gp41)
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	unit
UV	ultraviolett
V	Volt
Vif, <i>vif</i>	<i>Viral Infectivity Factor</i> , akzessorisches Protein und kodierendes Gen bzw. RNA von HIV-1
Vpr, <i>vpr</i>	<i>Viral Protein R</i> , akzessorisches Protein und kodierendes Gen bzw. RNA von HIV-1
Vpu, <i>vpu</i>	<i>Viral Protein U</i> , akzessorisches Protein und kodierendes Gen bzw. RNA von HIV-1
v/v	<i>volume to volume</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescence Protein</i>

9 Literaturverzeichnis

1. Amieux,P.S., Cummings,D.E., Motamed,K., Brandon,E.P., Wailles,L.A., Le,K., Idzerda,R.L., and McKnight,G.S. (1997). Compensatory regulation of RI alpha protein levels in protein kinase A mutant mice. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 3993-3998.
2. Arhel,N. and Kirchhoff,F. (2010). Host proteins involved in HIV infection: New therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, **1802**, 313-321.
3. Arrigo,S.J. and Chen,I.S.Y. (1991b). Rev Is Necessary for Translation But Not Cytoplasmic Accumulation of Hiv-1 Vif, Vpr, and Env/Vpu-2 Rnas. *Genes & Development*, **5**, 808-819.
4. Arrigo,S.J. and Chen,I.S.Y. (1991a). Rev Is Necessary for Translation But Not Cytoplasmic Accumulation of Hiv-1 Vif, Vpr, and Env/Vpu-2 Rnas. *Genes & Development*, **5**, 808-819.
5. Askjaer,P., Bachi,A., Wilm,M., Bischoff,F.R., Weeks,D.L., Ogniewski,V., Ohno,M., Niehrs,C., Kjems,J., Mattaj,I.W., and Fornerod,M. (1999). RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 6276-6285.
6. Askjaer,P., Jensen,T.H., Nilsson,J., Englmeier,L., and Kjems,J. (1998). The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 33414-33422.
7. Auer,M., Gremlich,H.U., Seifert,J.M., Daly,T.J., Parslow,T.G., Casari,G., and Gstach,H. (1994). Helix-Loop-Helix Motif in Hiv-1 Rev. *Biochemistry*, **33**, 2988-2996.
8. Banning,C., Votteler,J., Hoffmann,D., Koppensteiner,H., Warmer,M., Reimer,R., Kirchhoff,F., Schubert,U., Hauber,J., and Schindler,M. (2010). A Flow Cytometry-Based FRET Assay to Identify and Analyse Protein-Protein Interactions in Living Cells. *Plos One*, **5**.
9. Barresinoussi,F., Chermann,J.C., Rey,F., Nugeyre,M.T., Chamaret,S., Gruest,J., Dauguet,C., Axlerblin,C., Vezinetbrun,F., Rouzioux,C., Rozenbaum,W., and Montagnier,L. (1983). Isolation of A T-Lymphotropic Retrovirus from A Patient at Risk for Acquired Immune-Deficiency Syndrome (Aids). *Science*, **220**, 868-871.
10. Bevec,D., Jaksche,H., Oft,M., Wohl,T., Himmelspach,M., Pacher,A., Schebesta,M., Koettnitz,K., Dobrovnik,M., Csonga,R., Lottspeich,F., and Hauber,J. (1996). Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science*, **271**, 1858-1860.
11. Beyer,W.R., Westphal,M., Ostertag,W., and von Laer,D. (2002). Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: Generation, concentration, and broad host range. *Journal of Virology*, **76**, 1488-1495.
12. Bieniasz,P.D. and Cullen,B.R. (2000). Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. *Journal of Virology*, **74**, 9868-9877.
13. Bogerd,H.P., Fridell,R.A., Madore,S., and Cullen,B.R. (1995). Identification of A Novel Cellular Cofactor for the Rev/Rex Class of Retroviral Regulatory Proteins. *Cell*, **82**, 485-494.
14. Brandt,S., Blissenbach,M., Grewe,B., Konietzny,R., Grunwald,T., and Uberla,K. (2007). Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation. *Plos Pathogens*, **3**, 518-525.
15. Bray,M., Prasad,S., Dubay,J.W., Hunter,E., Jeang,K.T., Rekosh,D., and Hammarskjold,M.L. (1994). A Small Element from the Mason-Pfizer Monkey Virus Genome Makes Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Expression and Replication Rev-Independent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 1256-1260.

16. Bryant, M. and Ratner, L. (1990). Myristoylation-Dependent Replication and Assembly of Human Immunodeficiency Virus-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 523-527.
17. Campbell, L.H., Borg, K.T., Haines, J.K., Moon, R.T., Schoenberg, D.R., and Arrigo, S.J. (1994b). Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Rev Is Required In-Vivo for Binding of Poly(A)-Binding Protein to Rev-Dependent Rnas. *Journal of Virology*, **68**, 5433-5438.
18. Campbell, L.H., Borg, K.T., Haines, J.K., Moon, R.T., Schoenberg, D.R., and Arrigo, S.J. (1994a). Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Rev Is Required In-Vivo for Binding of Poly(A)-Binding Protein to Rev-Dependent Rnas. *Journal of Virology*, **68**, 5433-5438.
19. Chan, D.C. and Kim, P.S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell*, **93**, 681-684.
20. Chang, D.D. and Sharp, P.A. (1989a). Regulation by Hiv Rev Depends Upon Recognition of Splice Sites. *Cell*, **59**, 789-795.
21. Chang, D.D. and Sharp, P.A. (1989b). Regulation by Hiv Rev Depends Upon Recognition of Splice Sites. *Cell*, **59**, 789-795.
22. Chen, R.X., Quinones-Mateu, M.E., and Mansky, L.M. (2004). Drug resistance, virus fitness and HIV-1 mutagenesis. *Current Pharmaceutical Design*, **10**, 4065-4070.
23. Chen, T.P., Boisvert, F.M., Bazett-Jones, D.P., and Richard, S. (1999). A role for the GSG domain in localizing Sam68 to novel nuclear structures in cancer cell lines. *Molecular Biology of the Cell*, **10**, 3015-3033.
24. Clavel, F., Guetard, D., Brunvezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santosferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J.L., and Montagnier, L. (1986). Isolation of A New Human Retrovirus from West-African Patients with Aids. *Science*, **233**, 343-346.
25. Cochrane, A.W., Golub, E., Volsky, D., Ruben, S., and Rosen, C.A. (1989). Functional-Significance of Phosphorylation to the Human Immunodeficiency Virus Rev Protein. *Journal of Virology*, **63**, 4438-4440.
26. Cochrane, A.W., Jones, K.S., Beidas, S., Dillon, P.J., Skalka, A.M., and Rosen, C.A. (1991). Identification and Characterization of Intragenic Sequences Which Repress Human-Immunodeficiency-Virus Structural Gene-Expression. *Journal of Virology*, **65**, 5305-5313.
27. Cochrane, A.W., Perkins, A., and Rosen, C.A. (1990). Identification of Sequences Important in the Nucleolar Localization of Human Immunodeficiency Virus Rev - Relevance of Nucleolar Localization to Function. *Journal of Virology*, **64**, 881-885.
28. Cohen, C.D., Doran, P.P., Blattner, S.M., Merkle, M., Wang, G.Q., Schmid, H., Mathieson, P.W., Saleem, M.A., Henger, A., Rastaldi, M.P., and Kretzler, M. (2005). Sam68-like mammalian protein 2, identified by digital differential display as expressed by podocytes, is induced in proteinuria and involved in splice site selection of vascular endothelial growth factor. *Journal of the American Society of Nephrology*, **16**, 1958-1965.
29. Cook, K.S., Fisk, G.J., Hauber, J., Usman, N., Daly, T.J., and Rusche, J.R. (1991). Characterization of Hiv-1 Rev Protein - Binding Stoichiometry and Minimal Rna Substrate. *Nucleic Acids Research*, **19**, 1577-1583.
30. Coskun, A.K., van Maanen, M., Janka, D., Stockton, D., Stankiewicz, P., Yatsenko, S., and Sutton, R.E. (2007). Isolation and characterization of mouse-human microcell hybrid cell clones permissive for infectious HIV particle release. *Virology*, **362**, 283-293.
31. Coyle, J.H., Guzik, B.W., Bor, Y.C., Jin, L., Eisner-Smerage, L., Taylor, S.J., Rekosh, D., and Hammarskjold, M.L. (2003). Sam68 enhances the cytoplasmic utilization of intron-containing

- RNA and is functionally regulated by the nuclear kinase Sik/BRK. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 92-103.
32. Cullen,B.R. (1986). Transactivation of Human-Immunodeficiency-Virus Occurs Via A Bimodal Mechanism. *Cell*, **46**, 973-982.
 33. Cullen,B.R. (2003). Nuclear RNA export. *Journal of Cell Science*, **116**, 587-597.
 34. Dagostino,D.M., Felber,B.K., Harrison,J.E., and Pavlakis,G.N. (1992). The Rev Protein of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Promotes Polysomal Association and Translation of Gag/Pol and Vpu/Env Messenger-Rnas. *Molecular and Cellular Biology*, **12**, 1375-1386.
 35. Daly,T.J., Cook,K.S., Gray,G.S., Maione,T.E., and Rusche,J.R. (1989). Specific Binding of Hiv-1 Recombinant Rev Protein to the Rev-Responsive Element In vitro. *Nature*, **342**, 816-819.
 36. Daly,T.J., Doten,R.C., Rennert,P., Auer,M., Jaksche,H., Donner,A., Fisk,G., and Rusche,J.R. (1993a). Biochemical-Characterization of Binding of Multiple Hiv-1 Rev Monomeric Proteins to the Rev Responsive Element. *Biochemistry*, **32**, 10497-10505.
 37. Daly,T.J., Rennert,P., Lynch,P., Barry,J.K., Dundas,M., Rusche,J.R., Doten,R.C., Auer,M., and Farrington,G.K. (1993b). Perturbation of the Carboxy-Terminus of Hiv-1 Rev Affects Multimerization on the Rev Responsive Element. *Biochemistry*, **32**, 8945-8954.
 38. Daugherty,M.D., Liu,B., and Frankel,A.D. (2010). Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
 39. Dayton,E.T., Konings,D.A.M., Powell,D.M., Shapiro,B.A., Butini,L., Maizel,J.V., and Dayton,A.I. (1992). Extensive Sequence-Specific Information Throughout the Car Rre, the Target Sequence of the Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Rev Protein. *Journal of Virology*, **66**, 1139-1151.
 40. Di Fruscio,M., Chen,T.P., and Richard,S. (1999). Characterization of Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2: SLM-1 is a Src substrate during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 2710-2715.
 41. DiMattia,M.A., Watts,N.R., Stahl,S.J., Rader,C., Wingfield,P.T., Stuart,D.I., Steven,A.C., and Grimes,J.M. (2010). Implications of the HIV-1 Rev dimer structure at 3.2 angstrom resolution for multimeric binding to the Rev response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 5810-5814.
 42. Dull,T., Zufferey,R., Kelly,M., Mandel,R.J., Nguyen,M., Trono,D., and Naldini,L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology*, **72**, 8463-8471.
 43. Emerman,M., Vazeux,R., and Peden,K. (1989). The Rev Gene-Product of the Human Immunodeficiency Virus Affects Envelope-Specific Rna Localization. *Cell*, **57**, 1155-1165.
 44. Fang,J.H., Kubota,S., Yang,B., Zhou,N.M., Zhang,H., Godbout,R., and Pomerantz,R.J. (2004). A DEAD box protein facilitates HIV-1 replication as a cellular co-factor of Rev. *Virology*, **330**, 471-480.
 45. Fauci,A.S. (2006). Twenty-five years of HIV/AIDS. *Science*, **313**, 409.
 46. Fauci,A.S. (2007). 25 years of HIV/AIDS science: Reaching the poor with research advances. *Cell*, **131**, 429-432.
 47. Feinberg,M.B., Jarrett,R.F., Aldovini,A., Gallo,R.C., and Wongstaal,F. (1986). Htlv-ii Expression and Production Involve Complex Regulation at the Levels of Splicing and Translation of Viral-Rna. *Cell*, **46**, 807-817.

48. Felber,B.K., Hadzopouloucladaras,M., Cladaras,C., Copeland,T., and Pavlakis,G.N. (1989). Rev Protein of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Affects the Stability and Transport of the Viral Messenger-Rna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 1495-1499.
49. Feng,Y., Broder,C.C., Kennedy,P.E., and Berger,E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, **272**, 872-877.
50. Fischer,U., Huber,J., Boelens,W.C., Mattaj,I.W., and Luhrmann,R. (1995). The Hiv-1 Rev Activation Domain Is A Nuclear Export Signal That Accesses An Export Pathway Used by Specific Cellular Rnas. *Cell*, **82**, 475-483.
51. Fornerod,M., Ohno,M., Yoshida,M., and Mattaj,I.W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, **90**, 1051-1060.
52. Fouts,D.E., True,H.L., Cengel,K.A., and Celander,D.W. (1997). Site-specific phosphorylation of the human immunodeficiency virus type-1 Rev protein accelerates formation of an efficient RNA-binding conformation. *Biochemistry*, **36**, 13256-13262.
53. Frankel,A.D. and Young,J.A.T. (1998). HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry*, **67**, 1-25.
54. Freed,E.O. (2001). HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **26**, 13-33.
55. Fritz,C.C., Zapp,M.L., and Green,M.R. (1995). A Human Nucleoporin-Like Protein That Specifically Interacts with Hiv Rev. *Nature*, **376**, 530-533.
56. Fromont-Racine,M., Senger,B., Saveanu,C., and Fasiolo,F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, **313**, 17-42.
57. Gallo,R.C., Salahuddin,S.Z., Popovic,M., Shearer,G.M., Kaplan,M., Haynes,B.F., Palker,T.J., Redfield,R., Oleske,J., Safai,B., White,G., Foster,P., and Markham,P.D. (1984). Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (Htlv-ii) from Patients with Aids and at Risk for Aids. *Science*, **224**, 500-503.
58. Garber,M.E., Wei,P., KewalRamani,V.N., Mayall,T.P., Herrmann,C.H., Rice,A.P., Littman,D.R., and Jones,K.A. (1998). The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes & Development*, **12**, 3512-3527.
59. Gelderblom,H.R. (1991). Assembly and Morphology of Hiv - Potential Effect of Structure on Viral Function. *Aids*, **5**, 617-638.
60. Gorlich,D. and Mattaj,I.W. (1996). Protein kinesis - Nucleocytoplasmic transport. *Science*, **271**, 1513-1518.
61. Groom,H.C.T., Anderson,E.C., Dangerfield,J.A., and Lever,A.M.L. (2009a). Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *Journal of General Virology*, **90**, 1141-1147.
62. Groom,H.C.T., Anderson,E.C., and Lever,A.M. (2009b). Rev: beyond nuclear export. *Journal of General Virology*, **90**, 1303-1318.
63. Gruter,P., Taberner,C., von Kobbe,C., Schmitt,C., Saavedra,C., Bachi,A., Wilm,M., Felber,B.K., and Izaurralde,E. (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Molecular Cell*, **1**, 649-659.
64. Guatelli,J.C., Gingeras,T.R., and Richman,D.D. (1990). Alternative Splice Acceptor Utilization During Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Infection of Cultured-Cells. *Journal of Virology*, **64**, 4093-4098.

65. Guttler,T., Madl,T., Neumann,P., Deichsel,D., Corsini,L., Monecke,T., Ficner,R., Sattler,M., and Gorlich,D. (2010). NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
66. Hadzopouloucladaras,M., Felber,B.K., Cladaras,C., Athanassopoulos,A., Tse,A., and Pavlakis,G.N. (1989). The Rev (Trs Art) Protein of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Affects Viral Messenger-Rna and Protein Expression Via A Cis-Acting Sequence in the Env Region. *Journal of Virology*, **63**, 1265-1274.
67. Hakata,Y., Yamada,M., Mabuchi,N., and Shida,H. (2002). The carboxy-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 protein Rev has multiple roles in mediating CRM1-related Rev functions. *Journal of Virology*, **76**, 8079-8089.
68. Hamm,J. and Mattaj,I.W. (1989). An Abundant U6 Snrnp Found in Germ-Cells and Embryos of *Xenopus-Laevis*. *Embo Journal*, **8**, 4179-4187.
69. Hatziioannou,T., Martin-Serrano,J., Zang,T., and Bieniasz,P.D. (2005). Matrix-induced inhibition of membrane binding contributes to human immunodeficiency virus type 1 particle assembly defects in murine cells. *Journal of Virology*, **79**, 15586-15589.
70. Hauber,I., Bevec,D., Heukeshoven,J., Kratzer,F., Horn,F., Choidas,A., Harrer,T., and Hauber,J. (2005). Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 76-85.
71. Hauber,J., Bouvier,M., Malim,M.H., and Cullen,B.R. (1988). Phosphorylation of the Rev Gene-Product of Human Immunodeficiency Virus Type-1. *Journal of Virology*, **62**, 4801-4804.
72. Henao-Mejia,J., Liu,Y., Park,I.W., Zhang,J., Sanford,J., and He,J.J. (2009). Suppression of HIV-1 Nef Translation by Sam68 Mutant-Induced Stress Granules and nef mRNA Sequestration. *Molecular Cell*, **33**, 87-96.
73. Henderson,B.R. and Percipalle,P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: The Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *Journal of Molecular Biology*, **274**, 693-707.
74. Hofmann,W., Reichart,B., Ewald,A., Muller,E., Schmitt,I., Stauber,R.H., Lottspeich,F., Jockusch,B.M., Scheer,U., Hauber,J., and Dabauvalle,M.C. (2001). Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs: An unexpected role for actin. *Journal of Cell Biology*, **152**, 895-910.
75. Hong,W., Resnick,R.J., Rakowski,C., Shalloway,D., Taylor,S.J., and Blobel,G.A. (2002). Physical and functional interaction between the transcriptional cofactor CBP and the KH domain protein Sam68. *Molecular Cancer Research*, **1**, 48-55.
76. Huang,X.J., Hope,T.J., Bond,B.L., Mcdonald,D., Grahl,K., and Parslow,T.G. (1991). Minimal Rev-Response Element for Type-1 Human-Immunodeficiency-Virus. *Journal of Virology*, **65**, 2131-2134.
77. Huot,M.E., Vogel,G., and Richard,S. (2009). Identification of a Sam68 Ribonucleoprotein Complex Regulated by Epidermal Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 31903-31913.
78. Jain,C. and Belasco,J.G. (2001). Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants. *Molecular Cell*, **7**, 603-614.
79. Johnston,M.I. and Fauci,A.S. (2007). Current concepts: An HIV vaccine - Evolving concepts. *New England Journal of Medicine*, **356**, 2073-2081.

80. Jones, K.A. and Peterlin, B.M. (1994). Control of Rna Initiation and Elongation at the Hiv-1 Promoter. *Annual Review of Biochemistry*, **63**, 717-743.
81. Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.N., and Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & Development*, **19**, 104-113.
82. Kalland, K.H., Szilvay, A.M., Brokstad, K.A., Saetrevik, W., and Haukenes, G. (1994). The Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Rev Protein Shuttles Between the Cytoplasm and Nuclear Compartments. *Molecular and Cellular Biology*, **14**, 7436-7444.
83. Kaminski, R., Darbinian, N., Sawaya, B.E., Slonina, D., Amini, S., Johnson, E.M., Rappaport, J., Khalili, K., and Darbinyan, A. (2007). Pur alpha as a cellular co-factor of Rev/RRE-mediated expression of HIV-1 intron-containing mRNA. *Journal of Neurovirology*, **13**, 90-91.
84. Kang, H.A. and Hershey, J.W.B. (1994). Effect of Initiation-Factor Eif-5A Depletion on Protein-Synthesis and Proliferation of *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 3934-3940.
85. Kim, S.Y., Byrn, R., Groopman, J., and Baltimore, D. (1989). Temporal Aspects of Dna and Rna-Synthesis During Human Immunodeficiency Virus-Infection - Evidence for Differential Gene-Expression. *Journal of Virology*, **63**, 3708-3713.
86. Kjems, J. and Sharp, P.A. (1993). The Basic Domain of Rev from Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Specifically Blocks the Entry of U4/U6 U5 Small Nuclear Ribonucleoprotein in Spliceosome Assembly. *Journal of Virology*, **67**, 4769-4776.
87. Konig, R., Zhou, Y.Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M.C., Irelan, J.T., Chiang, C.Y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., Seidel, S., Opaluch, A.M., Caldwell, J.S., Weitzman, M.D., Kuhen, K.L., Bandyopadhyay, S., Ideker, T., Orth, A.P., Miraglia, L.J., Bushman, F.D., Young, J.A., and Chanda, S.K. (2008). Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell*, **135**, 49-60.
88. Kotsopoulou, E., Kim, V.N., Kingsman, A.J., Kingsman, S.M., and Mitrophanous, K.A. (2000). A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *Journal of Virology*, **74**, 4839-4852.
89. Kubota, S., Siomi, H., Satoh, T., Endo, S., Maki, M., and Hatanaka, M. (1989). Functional Similarity of Hiv-I Rev and Htlv-I Rex Proteins - Identification of A New Nucleolar-Targeting Signal in Rev Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **162**, 963-970.
90. Li, J.L., Liu, Y., Kim, B.O., and He, J.J. (2002a). Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway. *Journal of Virology*, **76**, 8374-8382.
91. Li, J.L., Liu, Y., Park, I.W., and He, J.J. (2002b). Expression of exogenous Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, is able to alleviate impaired Rev function in astrocytes. *Journal of Virology*, **76**, 4526-4535.
92. Li, J.Z., Tang, H.L., Mullen, T.M., Westberg, C., Reddy, T.R., Rose, D.W., and Wong-Staal, F. (1999). A role for RNA helicase A in post-transcriptional regulation of HIV type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 709-714.
93. Littman, D.R. (1998). Chemokine receptors: Keys to AIDS pathogenesis? *Cell*, **93**, 677-680.
94. Loflin, P.T., Chen, C.Y.A., Xu, N.H., and Shyu, A.B. (1999). Transcriptional pulsing approaches for analysis of mRNA turnover in mammalian cells. *Methods-A Companion to Methods in Enzymology*, **17**, 11-20.
95. Lukong, K.E. and Richard, S. (2003). Sam68, the KH domain-containing superSTAR. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, **1653**, 73-86.

96. Ma,J., Rong,L.W., Zhou,Y.D., Roy,B.B., Lu,J., Abrahamyan,L., Mouland,A.J., Pan,Q.H., and Liang,C. (2008). The requirement of the DEAD-box protein DDX24 for the packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology*, **375**, 253-264.
97. Maddon,P.J., Dalgleish,A.G., Mcdougal,J.S., Clapham,P.R., Weiss,R.A., and Axel,R. (1986). The T4 Gene Encodes the Aids Virus Receptor and Is Expressed in the Immune-System and the Brain. *Cell*, **47**, 333-348.
98. Madore,S.J., Tiley,L.S., Malim,M.H., and Cullen,B.R. (1994). Sequence Requirements for Rev Multimerization In-Vivo. *Virology*, **202**, 186-194.
99. Malim,M.H., Bohnlein,S., Hauber,J., and Cullen,B.R. (1989a). Functional Dissection of the Hiv-1 Rev Trans-Activator - Derivation of A Trans-Dominant Repressor of Rev Function. *Cell*, **58**, 205-214.
100. Malim,M.H. and 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**, 241-248.
101. Malim,M.H. and Cullen,B.R. (1993). Rev and the Fate of Premessenger Rna in the Nucleus - Implications for the Regulation of Rna Processing in Eukaryotes. *Molecular and Cellular Biology*, **13**, 6180-6189.
102. Malim,M.H., Hauber,J., Fenrick,R., and Cullen,B.R. (1988). Immunodeficiency Virus Rev Trans-Activator Modulates the Expression of the Viral Regulatory Genes. *Nature*, **335**, 181-183.
103. Malim,M.H., Hauber,J., Le,S.Y., Maizel,J.V., and Cullen,B.R. (1989b). The Hiv-1 Rev Trans-Activator Acts Through A Structured Target Sequence to Activate Nuclear Export of Unspliced Viral Messenger-Rna. *Nature*, **338**, 254-257.
104. Malim,M.H., Tiley,L.S., Mccarn,D.F., Rusche,J.R., Hauber,J., and Cullen,B.R. (1990). Hiv-1 Structural Gene-Expression Requires Binding of the Rev Trans-Activator to Its Rna Target Sequence. *Cell*, **60**, 675-683.
105. Mann,D.A., Mikaelian,I., Zimmel,R.W., Green,S.M., Lowe,A.D., Kimura,T., Singh,M., Butler,P.J.G., Gait,M.J., and Karn,J. (1994). A Molecular Rheostat - Cooperative Rev Binding to Stem-I of the Rev-Response Element Modulates Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Late Gene-Expression. *Journal of Molecular Biology*, **241**, 193-207.
106. Mariani,R., Rutter,G., Harris,M.E., Hope,T.J., Krausslich,H.G., and Landau,N.R. (2000). A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *Journal of Virology*, **74**, 3859-3870.
107. Mcdonald,D., Hope,T.J., and Parslow,T.G. (1992). Posttranscriptional Regulation by the Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Rev and Human T-Cell Leukemia-Virus Type-I Rex Proteins Through A Heterologous Rna-Binding Site. *Journal of Virology*, **66**, 7232-7238.
108. McLaren,M., Asai,K., and Cochrane,A. (2004). A novel function for Sam68: Enhancement of HIV-1 RNA 3' end processing. *Rna-A Publication of the Rna Society*, **10**, 1119-1129.
109. McLaren,M. and Cochrane,A. (2009). Mapping of determinants involved in the stimulation of HIV-1 expression by Sam68. *Virology*, **385**, 93-104.
110. Meyer,B.E. and Malim,M.H. (1994). The Hiv-1 Rev Transactivator Shuttles Between the Nucleus and the Cytoplasm. *Genes & Development*, **8**, 1538-1547.
111. Mikaelian,I., Krieg,M., Gait,M.J., and Karn,J. (1996). Interactions of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs. *Journal of Molecular Biology*, **257**, 246-264.

112. Modem,S., Badri,K.R., Holland,T.C., and Reddy,T.R. (2005). Sam68 is absolutely required for Rev function and HIV-1 production. *Nucleic Acids Research*, **33**, 873-879.
113. Najera,I., Krieg,M., and Karn,J. (1999). Synergistic stimulation of HIV-1 Rev-dependent export of unspliced mRNA to the cytoplasm by hnRNP A1. *Journal of Molecular Biology*, **285**, 1951-1964.
114. Nakielny,S., Fischer,U., Michael,W.M., and Dreyfuss,G. (1997). RNA transport. *Annual Review of Neuroscience*, **20**, 269-301.
115. Nalin,C.M., Purcell,R.D., Antelman,D., Mueller,D., Tomchak,L., Wegrzynski,B., Mccarney,E., Toome,V., Kramer,R., and Hsu,M.C. (1990). Purification and Characterization of Recombinant Rev Protein of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 7593-7597.
116. Neville,M., Stutz,F., Lee,L., Davis,L.I., and Rosbash,M. (1997). The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Current Biology*, **7**, 767-775.
117. Ohagen,A., Luftig,R.B., Reicin,A.S., Yin,L., Ikuta,K., Kimura,T., Goff,S.P., and Hoglund,S. (1997). The morphology of the immature HIV-1 virion. *Virology*, **228**, 112-114.
118. Ohno,M., Fornerod,M., and Mattaj,I.W. (1998). Nucleocytoplasmic transport: The last 200 nanometers. *Cell*, **92**, 327-336.
119. O Shea,E.K., Klemm,J.D., Kim,P.S., and Alber,T. (1991). X-Ray Structure of the Gcn4 Leucine Zipper, A 2-Stranded, Parallel Coiled Coil. *Science*, **254**, 539-544.
120. Park,M.H. (1989). The Essential Role of Hypusine in Eukaryotic Translation Initiation-Factor 4D (Eif-4D) - Purification of Eif-4D and Its Precursors and Comparison of Their Activities. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 18531-18535.
121. Park,M.H., Joe,Y.A., Kang,K.R., Lee,Y.B., and Wolff,E.C. (1996). The polyamine-derived amino acid hypusine: Its post-translational formation in eIF-5A and its role in cell proliferation. *Amino Acids*, **10**, 109-121.
122. Perales,C., Carrasco,L., and Gonzalez,M.E. (2005). Regulation of HIV-1 env mRNA translation by Rev protein. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **1743**, 169-175.
123. Perez-Caballero,D., Hatzioannou,T., Martin-Serrano,J., and Bieniasz,P.D. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 matrix inhibits and confers cooperativity on Gag precursor-membrane interactions. *Journal of Virology*, **78**, 9560-9563.
124. Perkins,A., Cochrane,A.W., Ruben,S.M., and Rosen,C.A. (1989). Structural and Functional-Characterization of the Human Immunodeficiency Virus Rev Protein. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, **2**, 256-263.
125. Pollard,V.W. and Malim,M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annual Review of Microbiology*, **52**, 491-532.
126. Pond,S.J.K., Ridgeway,W.K., Robertson,R., Wang,J., and Millar,D.P. (2009). HIV-1 Rev protein assembles on viral RNA one molecule at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 1404-1408.
127. Purcell,D.F.J. and Martin,M.A. (1993). Alternative Splicing of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Messenger-Rna Modulates Viral Protein Expression, Replication, and Infectivity. *Journal of Virology*, **67**, 6365-6378.
128. Reddy,T.R., Suhasini,M., Xu,W.D., Yeh,L.Y., Yang,J.P., Wu,J., Artzt,K., and Wong-Staal,F. (2002). A role for KH domain proteins (Sam68-like mammalian proteins and quaking proteins)

- in the post-transcriptional regulation of HIV replication. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 5778-5784.
129. Reddy, T.R., Xu, W.D., Mau, J.K.L., Goodwin, C.D., Suhasini, M., Tang, H.L., Frimpong, K., Rose, D.W., and Wong-Staal, F. (1999). Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nature Medicine*, **5**, 635-642.
 130. Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 326-331.
 131. Resh, M.D. (2004). A myristoyl switch regulates membrane binding of HIV-1 Gag. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 417-418.
 132. Rodriguez, M.S., Dargemont, C., and Stutz, F. (2004). Nuclear export of RNA. *Biology of the Cell*, **96**, 639-655.
 133. Rosen, C.A., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1985). Location of Cis-Acting Regulatory Sequences in the Human T-Cell Leukemia-Virus Type-I Long Terminal Repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**, 6502-6506.
 134. Rosen, C.A., Terwilliger, E., Dayton, A., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1988). Intragenic Cis-Acting Art Gene-Responsive Sequences of the Human Immunodeficiency Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 2071-2075.
 135. Ruhl, M., Himmelpach, M., Bahr, G.M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G.K., Probst, H., Bevec, D., and Hauber, J. (1993). Eukaryotic Initiation Factor-5A Is A Cellular Target of the Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Rev Activation Domain Mediating Transactivation. *Journal of Cell Biology*, **123**, 1309-1320.
 136. Sanchez-Velazquez, N., Udofia, E.B., Yu, Z., and Zapp, M.L. (2004). hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes & Development*, **18**, 23-34.
 137. Schatz, O., Oft, M., Dascher, C., Schebesta, M., Rosorius, O., Jaksche, H., Dobrovnik, M., Bevec, D., and Hauber, J. (1998). Interaction of the HIV-1 Rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 1607-1612.
 138. Schutz, S., Chemnitz, J., Spillner, C., Frohme, M., Hauber, J., and Kehlenbach, R.H. (2006). Stimulated expression of mRNAs in activated T cells depends on a functional CRM1 nuclear export pathway. *Journal of Molecular Biology*, **358**, 997-1009.
 139. Schwartz, S., Felber, B.K., Benko, D.M., Fenyo, E.M., and Pavlakis, G.N. (1990). Cloning and Functional-Analysis of Multiply Spliced Messenger-Rna Species of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1. *Journal of Virology*, **64**, 2519-2529.
 140. Schwartz, S., Felber, B.K., and 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. *Journal of Virology*, **66**, 150-159.
 141. Soros, V.B., Carvajal, H.V., Richard, S., and Cochrane, A.W. (2001). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by a dominant-negative mutant of Sam68 through sequestration of unspliced RNA at perinuclear bundles. *Journal of Virology*, **75**, 8203-8215.
 142. Stoss, O., Olbrich, M., Hartmann, A.M., Konig, H., Memmott, J., Andreadis, A., and Stamm, S. (2001). The STAR/GSG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 8665-8673.
 143. Stutz, F. and Izaurralde, E. (2003). The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends in Cell Biology*, **13**, 319-327.

144. Suhasini,M. and Reddy,T.R. (2009). Cellular Proteins and HIV-1 Rev Function. *Current Hiv Research*, **7**, 91-100.
145. Swanson,C.M. and Malim,M.H. (2008). SnapShot: HIV-1 proteins. *Cell*, **133**.
146. Swanson,C.M., Puffer,B.A., Ahmad,K.M., Doms,R.W., and Malim,M.H. (2004). Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. *Embo Journal*, **23**, 2632-2640.
147. Tang,C., Loeliger,E., Luncsford,P., Kinde,I., Beckett,D., and Summers,M.F. (2004). Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 517-522.
148. Terwilliger,E., Burghoff,R., Sia,R., Sodroski,J., Haseltine,W., and Rosen,C. (1988). The Art Gene-Product of Human Immunodeficiency Virus Is Required for Replication. *Journal of Virology*, **62**, 655-658.
149. Thomas,S.L., Hauber,J., and Casari,G. (1997). Probing the structure of the HIV-1 Rev trans-activator protein by functional analysis. *Protein Engineering*, **10**, 103-107.
150. Thomas,S.L., Oft,M., Jaksche,H., Casari,G., Heger,P., Dobrovnik,M., Bevec,D., and Hauber,J. (1998). Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *Journal of Virology*, **72**, 2935-2944.
151. Tiley,L.S., Malim,M.H., Tewary,H.K., Stockley,P.G., and Cullen,B.R. (1992). Identification of A High-Affinity Rna-Binding Site for the Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Rev Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 758-762.
152. Turner,B.G. and Summers,M.F. (1999). Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*, **285**, 1-32.
153. Wang,L., Xu,J., Zeng,L., Ye,X., Wu,Q.H., Dai,J.F., Ji,C.N., Gu,S.H., Zhao,C.H., Xie,Y., and Mao,Y.M. (2002a). Cloning and characterization of a novel human STAR domain containing cDNA KHDRBS2. *Molecular Biology Reports*, **29**, 369-375.
154. Wang,L., Xu,J., Zeng,L., Ye,X., Wu,Q.H., Dai,J.F., Ji,C.N., Gu,S.H., Zhao,C.H., Xie,Y., and Mao,Y.M. (2002b). Cloning and characterization of a novel human STAR domain containing cDNA KHDRBS2. *Molecular Biology Reports*, **29**, 369-375.
155. Wingfield,P.T., Stahl,S.J., Payton,M.A., Venkatesan,S., Misra,M., and Steven,A.C. (1991). Hiv-1 Rev Expressed in Recombinant Escherichia-Coli - Purification, Polymerization, and Conformational Properties. *Biochemistry*, **30**, 7527-7534.
156. Wolff,B., Sanglier,J.J., and Wang,Y. (1996). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export and function of HIV-1 Rev. *Molecular Biology of the Cell*, **7**, 1703.
157. Wolff,B., Sanglier,J.J., and 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. *Chemistry & Biology*, **4**, 139-147.
158. Yankulov,K. and Bentley,D. (1998). Transcriptional control: Tat cofactors and transcriptional elongation. *Current Biology*, **8**, R447-R449.
159. Yedavalli,V.S.R.K., Neuveut,C., Chi,Y.H., Kleiman,L., and Jeang,K.T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell*, **119**, 381-392.
160. Yi,R., Bogerd,H.P., Wiegand,H.L., and Cullen,B.R. (2002). Both Ran and importins have the ability to function as nuclear mRNA export factors. *Rna-A Publication of the Rna Society*, **8**, 180-187.

161. Yu,Z., Sanchez-Velar,N., Catrina,I.E., Kittler,E.L.W., Udofia,E.B., and Zapp,M.L. (2005). The cellular HIV-1 Rev cofactor hRIP is required for viral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 4027-4032.
162. Zapp,M.L. and Green,M.R. (1989). Sequence-Specific Rna-Binding by the Hiv-1 Rev Protein. *Nature*, **342**, 714-716.
163. Zapp,M.L., Hope,T.J., Parslow,T.G., and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 7734-7738.
164. Zimmel,R.W., Kelley,A.C., Karn,J., and Butler,P.J.G. (1996). Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element. *Journal of Molecular Biology*, **258**, 763-777.
165. Zhou,H.L., Xu,M., Huang,Q., Gates,A.T., Zhang,X.H.D., Castle,J.C., Stec,E., Ferrer,M., Strulovici,B., Hazuda,D.J., and Espeseth,A.S. (2008). Genome-Scale RNAi Screen for Host Factors Required for HIV Replication. *Cell Host & Microbe*, **4**, 495-504.

10 R + S Sätze für Gefahrenstoffe

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Acrylamid	T	45-46-20/2125-36/38-43-48/23/24/25-62	53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Blasticidin	T+	28	24/25-36/37-45
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Chloroquine	Xn	22	22-24/25
Cycloheximid	T, N	61-28-52/53-68	53-45
Dithiothreitol	Xn	22	36-38
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-68	26-28-36/37-45
Formamid	T	61	53-45
Isopropanol	F, Xi	11-36-67	2-7-16-24/25-26
Leptomycin B	T	23/25-36/38	7-16-24-33-45
2-Mercaptoethanol	T, N	20/22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
Methanol	T, F	11-23/24/25-39/23/24/25	1/2-7-16-36/37-45
Phenol	T, C	23/24/25-34-48/20/21/22-68	1/2-24/25-26-28-36/37/39-45
Puromycin	Xn	22	36
SDS	F, Xn	11-21/22-36/37/38	26-36/37
Schwefelsäure	C	35	26-30-45

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Banning,C., Votteler,J., **Hoffmann,D.**, Koppensteiner,H., Warmer,M., Reimer,R., Kirchhoff,F., Schubert,U., Hauber,J., and Schindler,M. (2010). **A Flow Cytometry-Based FRET Assay to Identify and Analyse Protein-Protein Interactions in Living Cells.** *Plos One*, 5

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Hauber für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können. Außerdem bedanke ich mich für seine engagierte Betreuung und die anregenden Diskussionen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Reinhard Bredehorst für die Begutachtung meiner Arbeit seitens des Departments Chemie der Universität Hamburg.

Ich bedanke mich bei Doreen Schwark, die in ihrer Doktorarbeit schon einen entscheidenden Grundstein für das Verständnis der Rev-Multimerisierung gelegt hat.

Ein großer Dank gilt natürlich der gesamten Abteilung Zellbiologie und Virologie des HPI und der HIV-Gruppe des UKE für eine sehr schöne Zeit und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Besonders bedanke ich mich bei Dorothea Pieper und Marcel Krepstakies, die mir in jeder Situation mit Rat und Tat zur Seite standen. Ebenso bedanke ich mich bei Jan Chemnitz, Helga Hofmann-Sieber, Claus-Henning Nagel und Ilona Hauber für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge.

Special thanks to Poornima Priyadarshini and Lakshmikanth Mariyanna for fruitful discussions and for their help.

Ich bedanke mich bei Dr. Klaus Wieggers, der mir, besonders am Anfang meiner Arbeit, viel über HIV-1 beibringen konnte.

Ich danke ganz besonders Bettina Abel und Andrea Lindner für Ihre Pipettierkunst bei den *Realtime* RT-PCR Analysen. Ein großer Dank gilt Niklas Beschorner für viele Maxi-Plasmidpräparation, die er mir abgenommen hat.

Ich bedanke mich bei Dr. Michael Schindler und Carina Banning für die Zusammenarbeit bei der FACS-basierten FRET Analyse. Hierbei bedanke mich auch besonders bei Britta Weseloh für die Herstellung der Rev Expressionskonstrukte.

Ich danke Maya für ihre persönliche und wissenschaftliche Kooperation.

Und ich möchte meiner Familie danken, die mich immer aus der Ferne unterstützt hat.