

**Kontinuierliche, zielgerichtete Evolution hochaffiner
Protein-Liganden für Therapie und Prävention am
Beispiel des HIV-1 Proteins Rev und seines zellulären
Cofaktors Sam68**

Dissertation

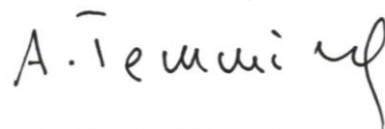
Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Patricia Meierhöfer
aus Kattowitz

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. T. DOBNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. R. WAGNER
Tag der Disputation: 19. August 2011

Hamburg, den 04. August 2011

A handwritten signature in black ink, reading "A. Temming". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping tail on the final letter.

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Meinen Eltern

1. Einleitung	1
1.1 Das humane Immundefizienzvirus HIV	1
1.1.1 Entdeckung und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Struktureller Aufbau von HIV-1	2
1.1.3 Virusreplikation.....	3
1.2 Das HI-virale Protein Rev	7
1.2.1 Funktion.....	7
1.2.2 Struktur	9
1.2.3 Rev-Interaktion mit dem <i>rev-responsive element</i> (RRE)	11
1.3 Antivirale Therapien gegen HIV.....	12
1.3.1 Hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART)	12
1.3.2 Neue Therapie-Strategien.....	13
1.4 Das zelluläre Protein Sam68	16
1.4.1 Struktur	17
1.4.2 Funktion.....	18
1.5 Phagen-Display.....	21
1.5.1 Biologie des filamentösen Bakteriophagen M13	21
1.5.2 Phagen-Display.....	22
1.6 Zielsetzung	24
2. Zusammenfassung	25
3. Ergebnisse.....	27
3.1 Identifizierung und Charakterisierung der Sam68-Bindestelle im Rev-Protein	27
3.1.1 Generierung von Rev-Deletionsmutanten.....	27
3.1.2 Co-Immunopräzipitation zur Analyse der Rev/Sam68-Interaktion <i>in vivo</i>	29
3.1.3 <i>Pull down</i> -Assay zur Analyse der Rev/Sam68-Interaktion <i>in vitro</i>	31
3.1.4 Funktionelle Charakterisierung der Rev-Deletionsmutanten.....	34
3.1.4.1 Oligomerisierung.....	34
3.1.4.2 Exportfähigkeit	37
3.1.4.3 Einfluss auf die HIV-Replikation	38
3.1.5 Subzelluläre Lokalisation der Rev-Deletionsmutanten	39
3.2 Identifizierung und Charakterisierung der Rev-Bindestelle im Sam68-Protein	41
3.2.1 Generierung von Sam68-Deletionsmutanten.....	41

3.2.2 Co-Immunopräzipitation zur Analyse der Rev/Sam68-Interaktion <i>in vivo</i>	43
3.2.3 FRET-Analyse zur Untersuchung der Rev/Sam68-Interaktion <i>in vivo</i>	46
3.2.4 <i>Pull down</i> -Assay zur Analyse der Rev/Sam68-Interaktion <i>in vitro</i>	47
3.2.5 Funktionelle Charakterisierung der Sam68-Deletionsmutanten.....	49
3.2.5.1 Einfluss auf den Export RRE-haltiger RNA.....	49
3.2.5.2 Einfluss auf die HIV-Replikation	51
3.2.5.3 Funktionalität im Kompetitions-Assay	52
3.2.6 Subzelluläre Lokalisation der Sam68-Deletionsmutanten	53
3.3 Gerichtete Evolution hochaffiner Sam68-Liganden	55
3.3.1 Herstellung einer SamR2-Bibliothek	55
3.3.2 Qualitätskontrolle der Bibliothek.....	57
3.3.3 Bio-Panning zur Selektion hochaffiner SamR2-Liganden	58
3.3.3.1 Panning mit der SamR2 _{M13K07} -Phagenbibliothek	60
3.3.3.2 Panning mit der SamR2 _{Hyperphage} -Phagenbibliothek.....	62
3.3.4 Analyse einzelner Binder	64
3.3.5 Charakterisierung des hochaffinen Klons GXI	65
3.3.5.1 <i>Pull down</i> -Assay zur Analyse der Rev-Interaktion <i>in vitro</i>	67
3.3.5.2 Co-Immunopräzipitation zur Analyse der Rev-Interaktion <i>in vivo</i>	68
4. Diskussion	70
4.1 Identifizierung und Charakterisierung der Sam68-Bindestelle im Rev-Protein	70
4.1.1 Die Sam68-Bindestelle im Rev-Protein: ein strukturelles Motiv	70
4.1.2 Gestörte Oligomerisierung der Rev-Deletionsmutanten an RRE-haltiger RNA.....	73
4.1.3 Einfluss der Rev-Deletionsmutanen auf den Export RRE-haltiger RNA	74
4.1.4 Einfluss der Rev-Deletionsmutanten auf die HIV-Replikation	75
4.1.5 Verändertes Lokalisationsmuster der Rev-Deletionsmutanten.....	75
4.2 Identifizierung und Charakterisierung der Rev-Bindestelle im Sam68-Protein	76
4.2.1 Die Rev-Bindestelle im Sam68-Protein: ein linearer Bereich.....	76
4.2.2 Sam68 – Synergie mit Rev	77
4.2.3 Einfluss der Sam68-Deletionsmutanten auf den Export und die HIV-Replikation.	77
4.2.4 Gehemmte Wiederherstellung der Rev-Funktion durch Deletion Rev-Interaktionsstelle in Sam68	79
4.2.5 Subzelluläre Lokalisation der Sam68-Deletionsmutanten	79

4.3 Gerichtete Evolution hochaffiner Sam68-Liganden	80
4.3.1 Polyvalentes vs. monovalentes Display	80
4.3.2 Charakterisierung des Klons GXI	81
4.3.3 <i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Analyse der Rev-Bindung der Klone GXI und GXI*	83
4.4 Kurzzusammenfassung und Ausblick	84
5. Material	87
5.1 Organismen	87
5.1.1 Zelllinien	87
5.1.2 Bakterienstämme	87
5.2 Medien	87
5.3 Kitsysteme	88
5.4 Puffer und Lösungen	88
5.5 Plasmide	91
5.6 Oligonucleotide	92
5.7 Chemikalien, Enzyme und Materialien	94
5.8 Antikörper	94
5.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien	95
5.10 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken	95
6. Methoden	96
6.1 Kulturhaltung	96
6.1.1 Eukaryotische Zellen	96
6.1.1.1 Kultivierung	96
6.1.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	96
6.1.2 Prokaryotische Zellen	96
6.2 Molekularbiologische Methoden	97
6.2.1 DNA-Methoden	97
6.2.1.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA	97
6.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	97
6.2.1.3 Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren	97
6.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	98
6.2.1.5 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	98
6.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	98

6.2.2 Herstellung der Plasmide.....	98
6.2.2.1 Prokaryotische Expressionsplasmide	99
6.2.2.2 Eukaryotische Expressionsplasmide	101
6.2.2.3 Phagemide	105
6.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	105
6.2.4 Primerannealing	106
6.2.5 Sequenzierung von DNA nach Sanger.....	107
6.2.6 Klonierung von DNA.....	107
6.2.6.1 Ligierung von DNA-Fragmenten.....	107
6.2.6.2 Ligierung der SamR2-Bibliothek.....	107
6.2.6.3 Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA.....	108
6.2.6.4 Elektroporation von TG1-Zellen	108
6.3 Proteinbiochemische Methoden.....	108
6.3.1 Rekombinante Expression.....	108
6.3.2 Affinitätschromatographie.....	109
6.3.2.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	109
6.3.2.2 Aufreinigung von GST-6xHis-Fusionsproteinen.....	110
6.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung	111
6.3.4 SDS-PAGE	111
6.3.5 Western Blotting und Immunodetektion.....	112
6.3.6 Pull down-Assay	113
6.3.7 Co-Immunopräzipitation	114
6.3.8 p24-ELISA.....	115
6.4 Phagen-Display.....	115
6.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien.....	115
6.4.2 Produktion von Phagenüberständen.....	116
6.4.3 Titration	117
6.4.4 PEG-Fällung	117
6.4.5 Bio-Panning.....	118
6.4.6 Phagen-ELISA.....	119
6.5 Zellbiologische Methoden.....	120
6.5.1 Transiente Transfektion.....	120

6.5.2 Zelllysate.....	121
6.5.3 FACS- und FRET-Analyse.....	121
6.5.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse.....	123
6.5.5 HIV-Replikations-Assay.....	123
7. Literaturverzeichnis.....	124
8. Anhang.....	132
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	132
8.2 Nucleotidsequenzen.....	136
Posterpräsentationen.....	138
Danksagung.....	139

1. Einleitung

1.1 Das humane Immundefizienzvirus HIV

1.1.1 Entdeckung und Epidemiologie

Im Jahre 1983 wurde ein neuartiges Retrovirus unabhängig voneinander von Luc Montagnier am Pasteur Institut in Paris und von Robert Gallo am nationalen Krebsinstitut in Bethesda entdeckt. Luc Montagnier bezeichnete dieses Virus als Lymphadenopathie-Virus (LAV-I), wohingegen Robert Gallo das Virus als humanes T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV-III) beschrieb^{1,2}. Wenig später wurden beide als möglicher Auslöser von AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) identifiziert und von nun an als HIV (*human immunodeficiency virus*) bezeichnet³.

Seit der Aufzeichnung der ersten AIDS-Erkrankungen hat sich das HI-Virus pandemisch auf der ganzen Welt ausgebreitet. Laut Schätzungen der Organisation UNAIDS waren Ende 2009 33.3 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert⁴.

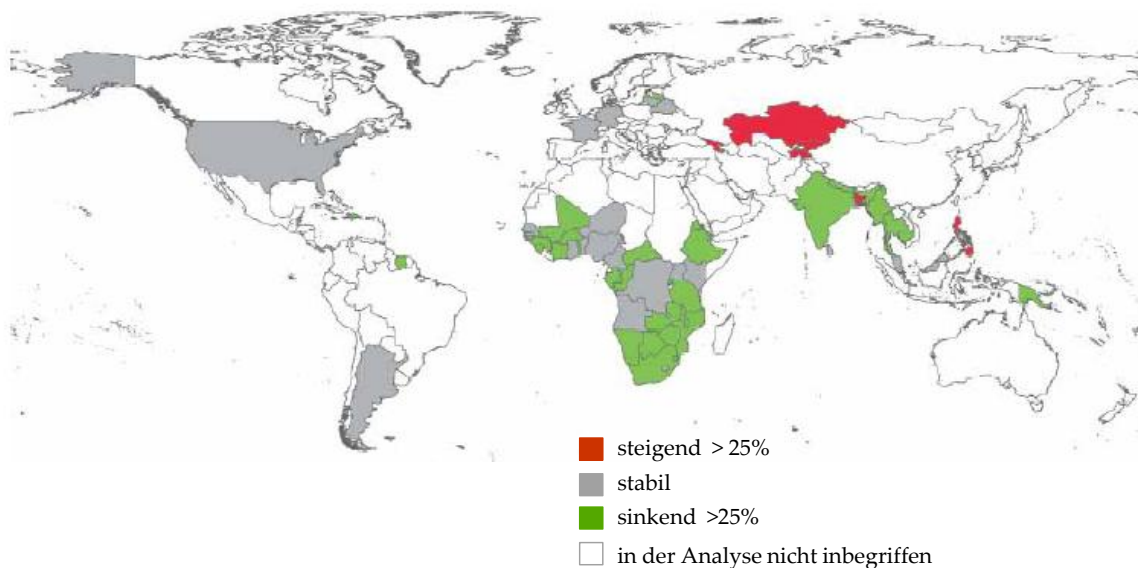


Abb. 1.1: Veränderungen in der Häufigkeitsrate von HIV-Infektionen zwischen 2001 und 2009 in ausgewählten Ländern (nach UNAIDS).

In 33 Ländern ist die HIV-Häufigkeitsrate zwischen 2001 und 2009 um mehr als 25 % gefallen, wobei 22 dieser Länder sich im südlich der Sahara gelegenen Teil Afrikas befinden (Abb. 1.1). Trotz dessen ist dieses Gebiet mit 22.5 Millionen Infizierten und einer Neuinfektionsrate von 1.8 Millionen im Jahr 2009 am schlimmsten von der HIV-Epidemie betroffen. Alarmierend ist aber auch der Zuwachs an HIV-positiven von mehr als 25 % in

bestimmten Ländern Vorder- und Zentralasiens sowie in Bangladesch und auf den Philippinen⁴. Die Raten jährlicher HIV-Neuinfektionen in Europa, Zentralasien und Nordamerika blieben in den letzten 5 Jahren relativ stabil. Nichtsdestotrotz spielt ungeschützter Verkehr bei Homosexuellen vor allem in einkommensstarken Ländern wieder eine besorgniserregende Rolle⁴. In Osteuropa und Zentralasien ist besonders die Wiederverwendung von benutzten Spritzen unter Drogenabhängigen für die hohe HIV-Übertragungsrate verantwortlich.

1.1.2 Struktureller Aufbau von HIV-1

Alle Retroviren besitzen einen ähnlichen Aufbau ihrer infektiösen Partikel und haben einen Durchmesser von ca. 100 nm (Abb. 1.2). Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das Capsid - aufgebaut aus dem p24-Anteil des gruppenspezifischen Antigens Gag - mit 2 identischen Kopien einzelsträngiger RNAs, welche einen Ribonucleotidkomplex mit dem Gag-Nucleocapsidprotein Ncp7, der reversen Transkriptase, der Protease und der Integrase ausbilden⁵. Das myristilierte Protein p17 (Matrixprotein) kleidet die Innenseite der Membran aus und ist über aminoterminaler Myristinsäurereste in der Lipidhüllmembran verankert, welche von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist. In dieser Hüllmembran ist das transmembrane Glykoprotein gp41 eingebettet und nichtkovalent mit dem extrazellulären Glykoprotein gp120 verbunden.

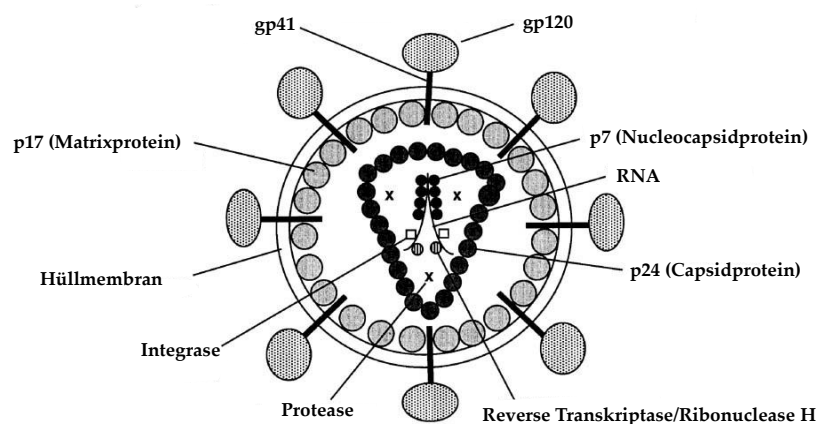


Abb. 1.2: Aufbau eines Retroviruspartikels am Beispiel des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1)⁶.

Der Aufbau des ca. 9.2 kb großen RNA-Genoms von HIV-1 erfolgt nach dem für Retroviren charakteristischen Organisationsschema 5'-LTR-gag-pol-env-LTR-3' (Abb. 1.3). Die *long terminal repeats* (LTRs) flankieren insgesamt 9 offene, überlappende Leserahmen, die alle *cis*-aktiven Sequenzen, Promotor- und Enhancer-Elemente für die Expression viraler

Genprodukte beinhalten ⁷. Alle viralen Proteine können gemäß ihrer Funktion und zeitlichen Expression in Gruppen unterteilt werden ⁵. Sowohl die Proteine Gag (*group-specific antigen*) und Env (*envelope*) als auch die *pol*-Genprodukte Protease, reverse Transkriptase und Integrase zählen zur Gruppe der Strukturproteine. Tat, Rev und Nef gehören zu den frühen regulatorischen Proteinen; Vif, Vpu und Vpr werden als späte akzessorische Proteine bezeichnet.

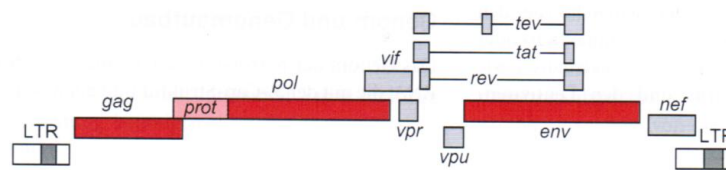


Abb. 1.3: Genomaufbau und Anordnung der neun Leseraster von HIV-1 nach der Integration ⁸. Abkürzungen siehe Text.

1.1.3 Virusreplikation

Viruseintritt

Die Zielzellen der HI-Viren sind T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen. All diese Zellen besitzen das Membran-Glykoprotein CD4, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, als zellulären Oberflächenrezeptor ⁹. In der Regel erkennt dieser im Zuge einer zellulären Immunantwort gemeinsam mit dem T-Zell-Rezeptor das mit einem Antigen beladene MHC-Klasse II Molekül. Bei der Adsorption der HI-Viren bindet die konservierte C3-Region des externen Teils des gp120-Proteins, welches als trimerer, glykosylierter Komplex in seiner nativen Konformation vorliegen muss, mit hoher Affinität an den CD4-Rezeptor ¹⁰. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung im gp120, wodurch die variable Region V3 exponiert wird und die Regionen V1 und V3 mit einem weiteren Oberflächenrezeptor, einem Chemokinrezeptor, interagieren ¹¹. Chemokinrezeptoren gehören zur Familie der Rhodopsinrezeptoren und sind charakteristisch mit sieben Transmembrandomänen in der Cytoplasmamembran verankert. Sie lösen in der Zelle Signalkaskaden aus, welche zu den G-Proteinen weitergeleitet werden ¹². HIV bevorzugt je nach Virusisolat den α -Chemokinrezeptor CXCR4 oder den β -Chemokinrezeptor CCR5. Dies erklärt den unterschiedlichen Zelltyp-Tropismus des Virus. Während Leukozyten, Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten typischerweise CXCR4 exprimieren und somit den lymphotropen HIV-Varianten (X4-Viren) als Eintrittspforte dienen, bilden Makrophagen und dendritische Zellen, aber auch Monozyten, T-Zellen und

natürliche Killerzellen den Rezeptor CCR5 aus und werden überwiegend von makrophagentropen Varianten (R5-Viren) infiziert¹³⁻¹⁵. Die hohe Sequenzvariabilität der V3-Region ist somit ausschlaggebend für den Zelltropismus von HIV. Die Bindung des gp120-Proteins an die Zielzelle hat konformationelle Umlagerungen im membranständigen gp41-Protein zur Folge, welches unmittelbar zur Verschmelzung der Virus- und Cytoplasmamembran der Wirtszelle führt. Die Fusionsreaktion vermittelt die aktivierte Ektodomäne von gp41 bestehend aus dem hydrophoben N-Terminus und einer N- und C-Helix. Strukturelle Analysen zeigten, dass diese Helices, im Kontext eines gp41-Trimers, antiparallel angeordnet sind, um ein sechs-Helixbündel auszubilden^{16,17}.

Post-Entry

Nach dem Eintritt des Capsids erfolgt nun der noch wenig erforschte Teil des Viruszyklus. Bei diesem als „*uncoating*“ bezeichneten Vorgang entlässt das Capsid seinen Inhalt ins Cytoplasma. Hierbei entsteht ein reverser Transkriptionskomplex (*reverse transcription complex*, RTC) bestehend aus dem Matrixprotein (MA), der Protease (PR), der reversen Transkriptase (RT), dem Nukleocapsidprotein (NC), der Integrase (IN) und einem als *virus protein rapid* (Vpr) bezeichneten akzessorischen Protein¹⁸⁻²⁰. Die RT schreibt das RNA-Genom in doppelsträngige DNA um, wobei diese während der DNA-Synthese der beiden Stränge 10^{-3} bis 10^{-4} falsche Basen einbaut und somit zu der bei Retroviren beobachteten hohen Mutationsrate beiträgt⁸. Die virale DNA wird nachfolgend als Teil des entstandenen Präintegrationskomplexes (PIC) aktiv in den Zellkern transportiert und mit Hilfe der assoziierten IN bevorzugt an transkriptions-aktiven Bereichen in das Wirtsgenom integriert^{21,22}. Hierbei können zelluläre Gene zerstört oder unter Kontrolle des 3'LTR-Promotors aktiviert werden. Weiterhin kann auch die Aktivität des 5'LTR-Promotors und somit die Transkription des Virusgenoms durch Integration an hochgradig methylierten oder genetisch inaktiven Abschnitten vermindert oder vollständig gehemmt werden.

Genexpression

An den LTRs wird die Transkription der viralen Gene durch zelluläre Polymerasen initialisiert. Hierbei spielen die *cis*-aktiven Sequenzelemente der U3-Region des LTR, an die verschiedene zelluläre Faktoren binden, eine wichtige Rolle für die RNA-Synthese²³. Die basale Transkriptionsaktivität des HIV-LTR ist sehr gering, wird aber durch die Anwesenheit des regulatorischen RNA-bindenden Tat (*transcriptional transactivator*)-Proteins um den Faktor 100 erhöht^{24,25}. Tat bindet zusammen mit den zellulären Faktoren CycT und

Cdk9, welche den Elongationsfaktor pTEF-b ausbilden, an die *stem loop*-Struktur TAR (*Tat activation region*), die sich am 5'-Terminus aller viralen mRNAs befindet ²⁶. Dies resultiert in einer Hyperphosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II und damit in einer drastisch gesteigerten, transkriptionellen Prozessivität ^{10,27}. Zudem kann Tat von den Zellen sezerniert und von Nachbarzellen aufgenommen werden, wo es zelluläre Funktionen und die Genexpression beeinflussen kann ^{28,29}. Unter anderem reguliert es die Expression von p53 (Tumorsuppressor), Bcl-2 (Kontrolle der Apoptose) und induziert die Expression der HIV-1 Corezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 ³⁰⁻³². In dieser frühen Phase der Infektion befinden sich drei verschiedene Klassen viraler mRNA im Zellkern: 1) ungespleißte mRNAs (ca. 9 kb), welche für die Gag- und Gag-Pol-Proteine codieren und den RNA-Genomen der HI-Viren entsprechen, 2) einfach gespleißte mRNAs mit einer Größe von ca. 5 kb, von denen die Proteine Env, Vif, Vpu und Vpr translatiert werden und 3) vollständig gespleißte mRNAs (ca. 2 kb groß), die für die Proteine Tat, Rev und Nef codieren und keine RRE (*rev-responsive element*)-Sekundärstruktur besitzen. Da die meisten zellulären mRNAs vollständig gespleißt sein müssen, um aus dem Zellkern auszutreten, stellt dies eine Barriere für die einfach und un-gespleißten Transkripte des Virus dar. Dieses Problem wird durch das Zusammenspiel des viralen Proteins Rev (*regulator of expression of viral proteins*) und des *cis*-aktiven RNA-Elements RRE umgangen ³³. Durch Bindung an die RRE-Sekundärstruktur im Intron im Bereich des *env*-Leserahmens multimerisiert Rev an RNA-Transkripten, die für die späten viralen Genprodukte codieren. Der Spleißprozess wird somit verhindert und die Transkripte werden ungespleißt mit Hilfe des Rev-Proteins ins Zytoplasma exportiert (1.2). Die Aktivität des Rev-Proteins ist also Voraussetzung für den Übergang von der frühen zur späten Zyklusphase.

Partikelproduktion

Die Synthese des Env-Glykoproteins erfolgt als Vorläuferprotein gp160 am rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER). Das Protein wird durch das Signalpeptid am N-Terminus in das Lumen des ER eingeschleust und an Asparaginresten glykosyliert. Im ER bildet gp160 intramolekulare Disulfidbrücken aus und oligomerisiert zu einem trimeren Komplex. Auf seinem Weg zur Zelloberfläche wird gp160 im Golgi-Netzwerk durch eine Furinprotease in das reife Oberflächenglykoprotein gp120 und das mit gp120 nichtkovalent verknüpfte transmembrane gp41-Protein gespalten ³⁴. gp120 wird anschliessend durch die Anheftung von komplexen Zuckern im Golgi-Netzwerk modifiziert. Durch die Interaktion

von gp41 mit der MA-Domäne des Gag-Vorläufers werden an der Oberfläche der infizierten Zellen Env-Glykoproteine in entstehende Viruspartikel verpackt ³⁵.

Die Virusassemblierung wird durch das Gag-Vorläuferprotein gesteuert, welches aus den Proteinen MA, CA, NC, dem *linker*-Protein p6_{gag} und den beiden Peptiden p1 und p2 besteht ³⁶. In 5-10 % aller Translationsereignisse entsteht aufgrund eines Leserastersprungs das Gag-Pol-Vorläuferprotein, welches neben den Proteinen MA, CA, NC und p1 anstelle von p2 und p6_{gag} das *transframe*-Protein p6*, die PR, RT und IN ausbildet. Die Gag- und Gag-Pol-Polypeptide werden an freien Ribosomen synthetisiert, wobei cotranslational das aminoterminal Methionin abgespalten und das folgende Glycin myristyliert wird, so dass die Proteine zur Cytoplasmamembran gelenkt werden und dort an die Innenseite der Membran binden ³⁷. Durch Akkumulation von Gag- und Gag-Pol-Molekülen wird an bestimmten Stellen der Cytoplasmamembran unter Beteiligung des p6_{gag}-Proteins die Ausstülpung und Abknospung unreifer Viruspartikel eingeleitet ^{10,38}. Diese bestehen aus Gag- und Gag-Pol-Proteinen, zwei Kopien der genomischen RNA, den viralen Proteinen Vpr, Nef und Vif, zellulären Proteinen sowie Env-Proteinen auf der Partikeloberfläche ³⁹. Das Verpackungssignal ψ , eine *cis*-aktive Sequenz in der *leader*-Region zwischen dem U5-Bereich und dem Gag-ORF (*open reading frame*) ungespleißter RNA, sorgt durch Interaktion mit Zinkfingermotiven der NC-Proteine in den Gag- und Gag-Pol-Vorläufern für die hochspezifische Verpackung ungespleißter, viraler RNA ^{40,41}. Vpr blockiert unter anderem den Zellzyklus in der G2-Phase und kann somit die Apoptose induzieren; desweiteren wirkt es am Transport des PIC in den Zellkern mit ⁴²⁻⁴⁴. Das Vif-Protein wird als Bestandteil des Nukleoproteinkomplexes in die Viruspartikel verpackt und beeinflusst die Infektiosität ¹⁰. Die Funktion des Pathogenitätsfaktors Nef ist sehr vielfältig ⁴⁵. Es reduziert die Expression der CD4- und MHC-Klasse I Moleküle auf der Oberfläche infizierter Zellen, stimuliert die Virusproduktion durch den Eingriff in zahlreiche, zelluläre Signalwege (z. B. Apoptose cytotoxischer T-Zellen, Aktivierung HIV-infizierter T-Zellen), kann aber auch die Menge anderer Proteine auf der Zelloberfläche (CD3, Chemokinrezeptoren, MHC-Klasse II-Proteine) verringern ⁴⁶⁻⁵².

Maturation

Im Anschluss folgen die Prozessierungsschritte, die zu einem reifen, infektiösen Viruspartikel führen. Essentiell hierfür ist die Aktivierung der viralen Protease, welche ihre volle Funktion als Dimer erst aufgrund der hohen lokalen Konzentration der Gag-/Gag-Pol-

Vorläuferproteine und des leicht sauren Milieus (bedingt durch die AS-Zusammensetzung der Virusproteine) im unreifen Viruspartikel entfalten kann^{53,54}. Eine vorzeitige Aktivierung der Protease würde die Assemblierung und die Virusfreisetzung verhindern. So werden die Proteinvorläufer kontrolliert in ihre Einzelkomponenten (MA, CA, NC, *linker*-Proteine, RT, IN) gespalten; zugleich erfolgen strukturelle Umlagerungen im Partikel und die Ausbildung des Capsids⁵⁵.

1.2 Das HI-virale Protein Rev

1.2.1 Funktion

Das Rev-Protein ist ein 116 Aminosäuren großes RNA-Bindeprotein mit einem Molekulargewicht von 13 kDa. Zwei Exons im Bereich des *env*-Gens codieren für das *rev*-Gen und werden durch Spleißprozesse zusammengeführt⁵⁶. Das Protein wird an zwei Serin-Aminosäureresten phosphoryliert. Diese posttranslationale Modifikation ist für die schnelle Ausbildung einer effizienten RNA-bindenden Konformation des Proteins essentiell⁵⁷. Es wurde gezeigt, dass Rev hauptsächlich im Zellkern und dem Nucleolus lokalisiert ist und die Kernporen in beide Richtungen passieren kann^{58,59}. Als *shuttle*-Protein transportiert Rev ungespleißte und einfach gespleißte mRNA-Spezies aus dem Zellkern ins Cytoplasma und trennt somit die frühe, Rev-unabhängige Phase von der späten, Rev-abhängigen Phase der mRNA-Translation. Ohne Unterstützung durch Rev würden die intronhaltigen Transkripte für die Proteine Gag, Pol, Env, Vif, Vpr und Vpu im Kern zurückgehalten und abgebaut werden. Im Zellkern bindet Rev spezifisch an die RNA-Sekundärstruktur RRE, eine ca. 234 Nucleotide-lange RNA-Sequenz im Bereich des *env*-Gens aller einfach gespleißten und ungespleißten mRNA-Moleküle, und ermöglicht so den Export ins Cytoplasma⁶⁰.

Der Export (Abb. 1.4) wird durch die Interaktion der Leucin-reichen Region von Rev, die das Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) birgt, mit dem zellulären Kernexportfaktor CRM-1 (*chromosome region maintenance gene 1*) eingeleitet^{61,62}. Dieser interagiert seinerseits mit Ran-GTP, so dass ein Komplex aus Rev, RRE-RNA, CRM-1 und Ran-GTP im Nucleus entsteht⁶³. CRM-1, auch als Exportin 1 bekannt, ist ein Transportrezeptor und gehört zur Importin- β -Familie. Dieser Ribonucleoproteinkomplex wird über eine Kernpore ins Cytoplasma exportiert und zerfällt dort durch die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP in seine Bestandteile. Rev wird durch Interaktion mit seiner Kernlokalisationsdomäne NLS

(*nuclear localization signal*) über einen weiteren Transportrezeptor, Importin- β , welcher zugleich an Ran-GDP gebunden ist, über eine Kernpore zurück in den Zellkern transportiert^{33,64,65}. Im Nucleus dissoziiert der Komplex in seine Bestandteile durch den Austausch von Ran-GDP zu Ran-GTP und entlässt sowohl das Rev-Protein als auch Importin- β für den nächsten Transportzyklus⁶⁴.

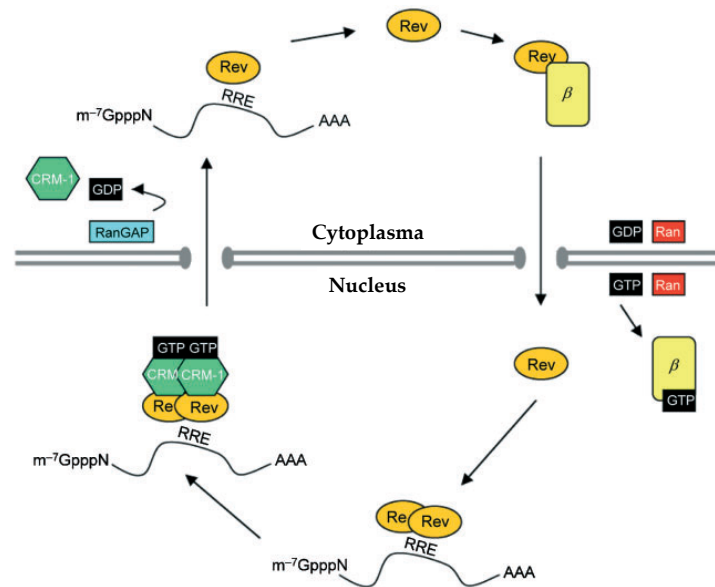


Abb. 1.4: Interaktionen von Rev während des Exports viraler, intronhaltiger RRE-RNA über den CRM-1/Ran-GTP-Zyklus (verändert nach⁶⁶).

In neuesten Studien konnten weitere Funktionen des Proteins aufgedeckt werden. Einerseits vermittelt es den Rev-abhängigen Kernexport viraler RNA-Spezies ins Cytoplasma, andererseits scheint es auch die Verpackung der ungespleißten RNA in virale Partikel, die auch als *template* für die Translation der Gag-Pol-Proteine dient, zu stimulieren^{67,68}. Eine mögliche Hypothese hierfür wäre, dass mit Hilfe von Rev die virale genomische RNA über den CRM-1-Zyklus in ein subcytoplasmatisches Kompartiment transportiert wird und dadurch nachfolgende sequenzspezifische Interaktionen des Gag-Nucleocapsids mit den Verpackungssignalen im 5'-UTR (*untranslated region*) der genomischen RNA begünstigt werden⁶⁸. Desweiteren erhöht es die Translationseffizienz und stimuliert die Proteinexpression durch Modulation des Verhältnisses verschieden gespleißter Transkripte im Nucleus und Cytoplasma^{66,69}. Ausserdem greift es durch die Regulation der Integrationsfrequenz des viralen Genoms in infizierten Zellen in die frühe Phase der viralen Replikation ein, um möglicherweise zellulären Superinfektionen vorzubeugen^{69,70}. Es konnte gezeigt werden, dass Rev mit der viralen Integrase wechselwirkt und Rev-abgeleitete Peptide die Integration des Virusgenoms in die Zielzelle hemmen; wohingegen Integrase-

abgeleitete Peptide, ähnlich wie bei einer Infektion mit einem *rev*-defizienten Virus, die Integration stimulieren ⁷⁰⁻⁷². Zudem interagiert Rev mit LEDGF/p75, dem zellulären Cofaktor der Integrase; beide Proteine konkurrieren um die gleiche Bindestelle in LEDGF/p75 ⁷¹. Dieses ist für die Anbindung des Präintegrationskomplexes an das Wirtschromatin durch direkte Interaktion mit der Integrase und/oder Hemmung der Degradation der Integrase im Proteasom zuständig ⁷³. Grewe und Überla stellten ein mögliches Modell zur Rev-vermittelten Reduktion der Integrationseffizienz während der frühen Phase des HIV-1 Replikationszyklus vor ⁶⁹. Dabei bindet Rev die Integrase, welche wiederum mit LEDGF/p75 interagiert. Durch die Rev-Bindung wird die Aktivität der Integrase gehemmt und die Bindung des Präintegrationskomplexes an das Wirtschromatin verhindert.

1.2.2 Struktur

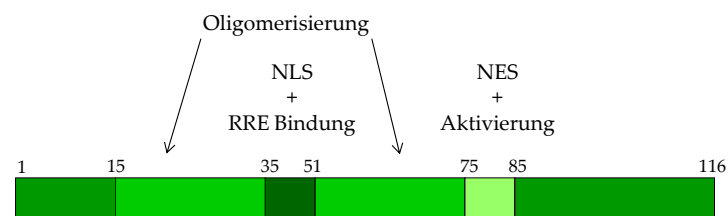


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Rev-Domänen.

Der N-terminale Bereich erstreckt sich von AS 1-74 und beinhaltet die beiden Oligomerisierungsbereiche (AS 15-34 und AS 51-74), sowie die RRE-Bindestelle und das Kernlokalisierungssignal NLS (AS 35-50). Der C-terminale Bereich erstreckt sich von AS 75-116 und enthält die Aktivierungsdomäne und das Kernexportsignal NES (AS 75-84). AS: Aminosäure; NES: *nuclear export signal*; NLS: *nuclear localization signal*; RRE: *rev responsive element*.

Die N-terminale Region (AS 1-74) besteht aus zwei Oligomerisierungsdomänen (AS 15-34 und AS 51-74), die eine 15 Aminosäuren lange Sequenz (AS 35-50) mit einem Argininreichen, zentralen Kern, dem Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) flankieren ⁷⁴. In dieser Domäne befindet sich ebenfalls der RRE (*rev-responsive element*)-Bindebereich, über den Rev an seine RNA-Zielstruktur bindet ⁷⁵. Studien der Rev-RRE Assemblierung belegen, dass sich Rev-Monomere nach Bindung an RRE zu höheren Komplexen zusammenlagern und durch kooperative Protein-Protein- und Protein-RNA-Interaktionen stabilisiert werden ⁷⁶⁻⁷⁸. Diese Oligomerisierung ist überaus wichtig für die Aktivität des Proteins und somit für die Replikation von HIV-1 ^{76,77,79,80}. Die genaue Anzahl der erforderlichen Rev-Monomere zur Bildung eines solchen Aktivierungskomplexes war lange Zeit unbekannt ⁸¹. *In vitro*-Bindungsstudien an das RRE zeigen, dass mindestens acht oder mehr Rev-Moleküle an ein einziges RRE binden könnten ⁸²⁻⁸⁴. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass vermutlich 6 Rev-Moleküle auf dem RRE assemblieren ⁸⁵. Zelluläre Cofaktoren

sollen die Oligomerisierung von Rev erleichtern ⁸⁶. Die C-terminale Region (AS 75-116) des Rev-Proteins beinhaltet ein Leucin-reiches Motiv, das als Proteinaktivierungsdomäne (AS 75-84) bezeichnet wird. Über dieses erfolgt die Interaktion mit zellulären Proteinen, welche für die Rev-Aktivität von entscheidender Bedeutung sind ^{87,88}. Ausserdem ist dort das für den Rev-vermittelten Kernexport viraler mRNA-Spezies essentielle Exportsignal (*nuclear export signal*, NES) lokalisiert ⁸⁹. Unter den für die Rev-Aktivität wichtigen, zellulären Interaktionspartnern befindet sich auch der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A), welcher womöglich als Adapterprotein zwischen der viralen RNA und der zellulären Exportmaschinerie fungiert ⁹⁰⁻⁹². Das poly(A)-bindende Protein 1 (PABP1) assoziiert Rev-abhängig mit cytoplasmatischen HIV-1 RNA-Molekülen und scheint eine Rolle in der Translation zu spielen ⁹³. Desweiteren bindet die RNA-Helikase A (RHA) Rev-abhängig an das RRE und erhöht die virale Expression ⁹⁴. Das zelluläre Protein Pura wurde in jüngsten Studien als Bindepartner von Rev und RRE entdeckt ⁹⁵. Die DEAD-box Helikase DDX3 und das *human Rev-interacting protein* (hRIP) scheinen ebenfalls die Rev-Funktion zu transaktivieren und die virale Replikation zu erhöhen ⁹⁶⁻¹⁰⁰. Ein Interaktionspartner, welchem im Hinblick auf den Rev-Kernexport große Aufmerksamkeit und Bedeutung zugeschrieben wurde, ist das zelluläre Protein Sam68 (1.4).

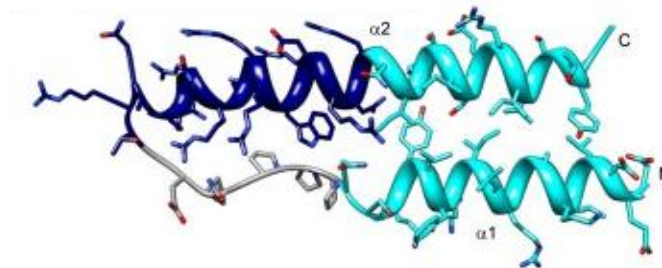


Abb. 1.6: Ribbon-Darstellung eines Rev-Monomers ¹⁰¹.

Die N-terminale Domäne von Rev bildet ein Helix-loop-Helix-Motiv aus. Der ersten α -Helix ($\alpha 1$, türkis) folgt eine loop-Region (grau), welche anschliessend in die zweite längere α -Helix ($\alpha 2$, blau-türkis) übergeht. Die RRE-Bindestelle in der zweiten α -Helix ist dunkelblau markiert. Es entsteht somit eine kombinierte Oberfläche, die als potentielle intermolekulare Bindestelle, unter anderem für zelluläre Proteine, dienen könnte ⁸¹. $\alpha 1$: erste α -Helix; $\alpha 2$: zweite α -Helix; C: C-Terminus; N: N-Terminus.

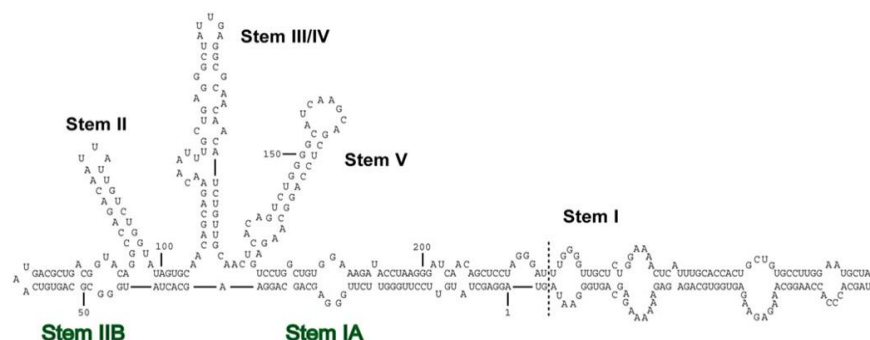
Die Sekundärstruktur des Rev-Proteins beschreibt, dass der N-Terminus mit den beiden Oligomerisierungsdomänen und der dazwischen liegenden RRE-Bindestelle eine Helix-loop-Helix-Struktur ausbildet, wobei die beiden Helices durch intramolekulare, hydrophobe Kräfte stabilisiert werden ^{81,102}. Die Tertiärstruktur konnte lange Zeit nicht aufgeklärt werden, da die Kristallisation von Rev aufgrund seiner Neigung in Lösung zu einem Filamentkomplex zu oligomerisieren, nicht möglich war ¹⁰³. Durch die Entwicklung eines Fab

(Antigen-bindenden)-Fragments, welches die Polymerisierung von Rev durch starke Interaktion unterbindet und somit das Protein strukturell stabilisiert, konnte erst kürzlich ein Rev-Fab-Komplex aufgereinigt und kristallisiert werden ¹⁰⁴. Obwohl das Volllänge-Rev-Protein in den Kristallen vorhanden war, konnte aber nur die N-terminale Domäne (AS 9-65) aufgelöst werden ¹⁰¹. Die dreidimensionale Struktur ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

1.2.3 Rev-Interaktion mit dem *rev-responsive element* (RRE)

Voraussetzung für den viralen RNA-Export ist die kooperative Bindung mehrerer Rev-Moleküle an die RRE-Sekundärstruktur und somit die Assemblierung zu einem hochspezifischen Ribonucleoprotein (RNP) ^{77,105}. Das RRE-Element ist eine 234 bp lange Region innerhalb des *env*-Leserahmens und besteht aus vier Schleifen (Stemloop II-V) und einem Hauptstamm (Stem I) (Abb. 1.7a) ^{58,106}. Für die Rev-Bindung ist hauptsächlich der Stemloop IIB und IA relevant. Beide bilden aus nicht gepaarten Nucleotiden eine kleine, Purin-reiche Blase aus ^{62,82,107,108}. Biochemische Studien zeigten, dass unter anderem zwei bestimmte Sets an konservierten Aminosäuren für die Oligomerisierung von 6 Rev-Molekülen an einem RRE von Bedeutung sind. Die Aminosäuren Leu18, Phe21 und Ile55 werden für die Ausbildung einer Dimerisierungsoberfläche benötigt, wohingegen Leu12, Val16 und Leu60 eine höher geordnete Oligomerisierungsoberfläche ausbilden ^{109,110}. Diese Erkenntnisse und die Auflösung der kristallinen Struktur des Proteins ermöglichten es, ein Modell für die Oligomerisierungs-vermittelte kooperative Assemblierung zu einem Exportfähigen Ribonucleoprotein-Komplex (RNP) aufzustellen ¹⁰⁹. Die Bindung eines Rev-Monomers an das RRE erfolgt zunächst am Stemloop IIB ^{108,111}. Ein zweites Rev-Monomer kann erst binden, wenn die zusammengesetzte Bindestelle aus der Dimerisierungsoberfläche und der zweiten RNA-Bindestelle genau ausgerichtet ist ^{84,109}. Weitere Oligomerisierungs- und Protein-RNA-Interaktionen führen gleichermaßen zur Formation des fertigen Rev-RRE RNPs-Komplexes (Abb. 1.7b).

a)



b)

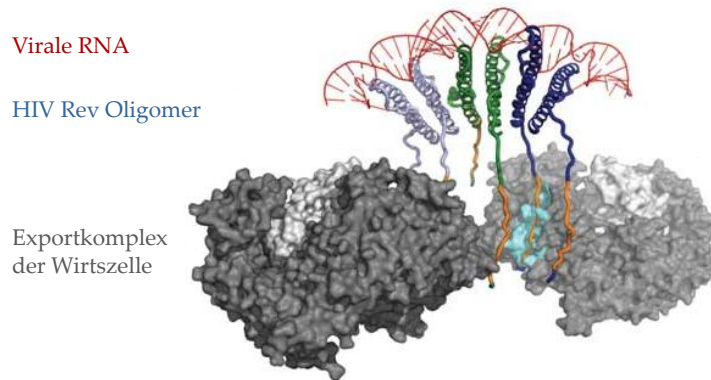


Abb. 1.7:

a) Dargestellt ist die Sekundärstruktur des RRE-Elements (verändert nach ¹⁰⁵).

b) Modell des Rev-RRE RNP Komplexes und Interaktion mit CRM-1 (verändert nach ¹⁰⁹).

Zur Veranschaulichung wurde an jedes der drei Rev-Dimere (jeweils als Helix dargestellt) eine RNA (rot) gebunden. Die Dimere stehen durch AS-Interaktionen miteinander in Verbindung (hier nicht gekennzeichnet). Der C-Terminus mit dem Kernexportsignal NES ist hier als *random coil*-Verlängerung (orange) zu sehen. Die NES-Bindestelle in CRM-1 ist cyan markiert. Das RNP bindet über NES an den CRM-1/RanGTP Komplex (grau).

1.3 Antivirale Therapien gegen HIV

1.3.1 Hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART)

Bei der HAART-Therapie werden normalerweise vier unterschiedliche Wirkstoffklassen eingesetzt, die gezielt einzelne Schritte des Viruszyklus inhibieren:

- 1) Nucleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs)
- 2) Nicht-nucleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs)
- 3) Protease-Inhibitoren (PIs)
- 4) Fusionsinhibitoren

In der Regel wird bei der HAART-Therapie eine Kombination aus drei Wirkstoffen aus mindestens zwei Wirkstoffklassen verabreicht (zur Übersicht Potter *et al.*, 2004 ¹¹²).

NRTIs sind gegen die virale reverse Transkriptase (RT) gerichtet. In der Zelle konkurrieren sie mit den endogenen Nucleosiden um den Einbau in die DNA, welche durch die RT generiert wird. Hierzu müssen sie aber erst zu Triphosphatderivaten in der Zelle phosphoryliert werden. Resistenzen gegen die NRTIs entstehen durch Basenaustausche in der RT, die zu AS-Substitutionen führen können ^{113,114}.

NNRTIs greifen ebenfalls die RT an, allerdings müssen sie nicht durch die Zelle aktiviert werden und sind kein Substrat des Enzyms. Sie binden die RT nahe des aktiven Zentrums und führen zu einer Konformationsveränderung, die in einer Blockade resultiert. Schon eine einzige Mutation kann eine hohe Resistenz gegenüber den NNRTIs zur Folge haben ¹¹².

Protease-Inhibitoren richten sich gegen das aktive Zentrum der viralen Protease, die Voraussetzung für die Ausbildung infektiöser Viruspartikel ist. Resistenzen entstehen aufgrund von AS-Substitutionen am oder in der Nähe des aktiven Zentrums und stören die Bindung des Inhibitors aufgrund von Konformationsveränderungen ¹¹⁵.

Fusionsinhibitoren hemmen den Eintritt des Virus in die Wirtszelle. Der T20-Inhibitor interagiert mit dem gp41-Transmembranprotein und hemmt die Ausbildung des Helixbündels, welches für die Fusion unerlässlich ist. Resistenzen gehen hauptsächlich mit Mutationen in der Env gp41-Region einher ¹¹². Patienten mit NRTI-, NNRTI- und PI-resistenten Viren können, mit T20 therapiert werden.

1.3.2 Neue Therapie-Strategien

Aufgrund der zahlreichen Resistenzentwicklungen während einer HAART-Therapie und der extremen Nebenwirkungen, wird gezielt nach anderen Möglichkeiten zur Behandlung der Infektion gesucht. Die Gentherapie bietet hierbei eine interessante Alternative.

Die Infektion oder Transfektion von Zellen mit einem Virus- oder einem DNA-Konstrukt, welches in der Lage ist, die Virusreplikation dominant zu hemmen, wird als „intrazelluläre Immunisierung“ bezeichnet ¹¹⁶. Man unterscheidet dabei Protein- und RNA-basierte Therapieansätze (zur Übersicht Nielsen *et al.*, 2005 ¹¹⁷). Der Vorteil RNA-basierter Strategien liegt in der fehlenden Immunogenität. Als Angriffspunkt dienen entweder virale oder zelluläre Faktoren, wobei letztere die Entwicklung von *escape*-Mutanten potentiell schwächen ¹¹⁸. Die antiviralen Transkripte werden in drei Klassen eingeteilt, je nachdem welcher Replikationsschritt gehemmt werden soll. Klasse I sind Gene der frühen Phase bis zur Integration, Klasse II betrifft die späte Phase viraler Genexpression, und Klasse III die Assemblierung und Partikelfreisetzung, wobei Inhibitoren gegen Klasse I-Gene besonders erstrebenswert sind, da die Integration des Provirus ins Wirtsgenom unterbunden wird ¹¹⁹.

Zielzellen der Gentherapie sind hämatopoetische Stammzellen (HSPC), welche aus dem Knochenmark gewonnen werden können. Der Vorteil der HSPCs ist die Differenzierung in Zelltypen, die von HIV potentiell angegriffen werden: Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Microglia und CD4+ T-Lymphozyten ¹²⁰⁻¹²². Reine CD4+ T-Lymphozyten werden ebenfalls sehr oft für die Gentherapie herangezogen, da sie relativ einfach gewonnen werden können; diese müssen aber in größerer Menge re-infundiert werden ¹²³⁻¹²⁵. In beiden Fällen führt der selektive Druck durch das Virus zum Überleben der transformierten Zellen

und dadurch zu einem Abfall der Viruslast aufgrund gehemmter Virusreplikation^{126,127}. Für den Gentransfer werden retrovirale (murines Leukämie-Virus) oder lentivirale Vektoren verwendet, wobei letztere den Vorteil haben auch nicht-teilende Zellen zu infizieren¹²⁸. Nachteile dieser Therapieform sind die hohen Sicherheitsrisiken, da die Lentiviren die Fähigkeit besitzen zu replikationskompetenten Viren zu rekombinieren. Bei Retroviren besteht weiterhin die Gefahr der Oncogenese. Wie bereits erwähnt sollten neue Therapieansätze vor allem gut wirksam - auch gegen multiresistente Viren - und verträglich sein. Der Wirkstoff sollte spezifisch in virale Replikationsprozesse, die mit den gängigen Wirkstoffen nicht attackiert werden, eingreifen können. Aus diesem Grund ist das Rev-Protein mit seiner zentralen Rolle im HIV-Metabolismus ein sehr interessanter Kandidat für eine Gentherapie. In den folgenden Absätzen werden deshalb Ansätze zur Gentherapie und auch alternative Ansätze bezüglich des viralen Rev-Proteins erläutert. Eine detaillierte Übersicht über verschiedene Ansätze beschreibt Nielsen *et al.*¹¹⁷.

Protein-basierte Ansätze

Das am besten charakterisierte transdominant negativ wirkende Protein ist die RevM10-Mutante. Durch Substitutionen (LE78DL) in der Kernexportsequenz des Proteins ist die Interaktion mit wichtigen zellulären Kofaktoren gestört. Der Transport viraler RNA ins Cytoplasma und somit die Replikation werden verhindert^{80,129}. Aufgrund der Mutationen ist RevM10 im Zellkern lokalisiert. Die RNA-Bindedomäne, sowie die Oligomerisierungsdomänen der Mutante sind durch die Substitutionen nicht beeinträchtigt. RevM10 wurde als Inhibitor in klinischen Studien bereits eingesetzt. Dabei zeigten RevM10-exprimierende CD4⁺-Zellen eine längere Überlebensdauer, was diesen Ansatz besonders erfolgversprechend macht¹³⁰. Desweiteren wurden keine Immunantworten gegen RevM10 beobachtet. Veränderungen in der CD4-Zahl oder der Viruslast traten in diesen klinischen Phase I-Studien, wie erwartet, nicht auf¹²⁷.

Eine weitere transdominant negative Mutante, Sam68 Δ C, ist ebenfalls in der Lage, die Rev-Funktion zu inhibieren (1.4.2) und wäre ein potentieller Kandidat für eine anti-Rev-Therapie¹¹⁷.

sFvs sind monoklonale *single-chain* Antikörper, die gegen Rev gerichtet intrazellulär exprimiert werden. Diese rekrutieren das Rev-Protein ins Cytoplasma und beschleunigen seinen Abbau¹³¹⁻¹³³.

NS1RM-Rev ist ein chimäres Protein, bestehend aus dem Rev-Protein und einer kovalent gebundenen mutierten Form des NS1-Proteins von Influenza A. Es bildet mit dem Wildtyp Rev Heterooligomere und hemmt den Export viraler Transkripte, da die Kernretentionsaktivität von NS1 über die Kernexportaktivität von Rev dominiert. Der antivirale Effekt ist mit dem der RevM10-Mutante vergleichbar ¹³⁴.

Zuletzt besteht die Möglichkeit gezielt Peptide gegen die NES-Domäne einzusetzen und die Rev-Funktion zu hemmen ¹³⁴.

RNA-basierte Ansätze

RRE-RNA *decoys* sind kurze Nucleotidsequenzen mit Bereichen aus dem RRE, die die Bindung an das virale RRE-Element unterbinden, indem sie mit Rev interagieren. Ein Beispiel hierfür ist das 41 Nucleotide-lange RRE-SLIAB-RNA *decoy*, welches bereits in klinischen Studien untersucht wurde ^{121,135}. Durch Transduktion humaner, hämatopoetischer Vorläuferzellen mit einem retroviralen Vektor, der das RRE *decoy* exprimierte, wurde eine Hemmung der HIV-1-Replikation in primären humanen, myelomonocytischen Zellen ohne negative Effekte auf die hämatopoetische Zellfunktion beobachtet ¹²¹.

RNA Aptamere besitzen eine höhere Affinität zu Rev als die RRE-Sequenz und erkennen andere Epitope als die natürliche RNA-Bindestelle von Rev ¹¹⁷. Somit können sie die eigentliche Funktion des Rev-Proteins behindern.

Eine weitere Möglichkeit, die Rev/RRE-Interaktion zu stören, ist der Einsatz von *antisense* RNAs. Diese stören, gegen das RRE gerichtet, die Rev-Bindung, gegen die Rev-RNA gerichtet, die Expression des Rev-Proteins ¹³⁶. Letzteres zeigte in chronisch infizierten Zellen antivirale Aktivität ¹³³. Leider erwies sich die *antisense* RNA als ein therapeutisches Agens wenig erfolgversprechend aufgrund von Faktoren wie Wirksamkeit, Zellpermeabilität, Herstellung und Kosten ¹¹⁷.

Die Verwendung von Ribozymen ermöglicht das Schneiden der RRE-RNA oder der Rev-codierenden RNA und somit die Hemmung der Virusreplikation. Zu diesem Zweck werden *Hammerhead*-Ribozyme herangezogen, die als katalytisches RNA-Molekül die RNA an spezifischen Sequenzen schneiden können. Aufgrund ihrer einfachen Handhabung wurde diese Methode intensiv untersucht und erreichte bereits in Kombination mit dem HIV *tat*-Gen klinische Studien ^{127,132,137}.

Die Fusion des Rev-Proteins mit einer Nuclease erhöht deren Affinität gegenüber dem RRE und besitzt die potentielle Fähigkeit spezifisch alle HI-viralen RNA-Spezies mit der RRE-Sequenz zu schneiden ¹³⁸.

Alternative Ansätze:

Eine weitere Möglichkeit zur Behandlung von HIV könnte der Einsatz von *small interfering* RNAs (siRNAs) sein. Hierzu macht man sich kurze RNA-Sequenzen von 21-25 Nucleotiden zu Nutze, die komplementär zu ihrem Zielgen erstellt werden. Sie bewirken in den Zellen eine RNA-Interferenz und veranlassen die Degradation der Ziel-RNA. Gegen *rev* gerichtete siRNAs zeigten eine potentielle Reduktion bzw. Hemmung der Virusreplikation ^{139,140}.

Zuletzt wurden Strategien mit kleinen Molekülen von geringem Molekulargewicht verfolgt, die entweder durch Interaktion mit zellulären Wirtsfaktoren oder dem RRE-Element die Rev-Funktion hemmen ^{117,133,134}. So blockiert Leptomycin B (LMB) durch Interaktion mit CRM-1 die Bindestelle der Rev-NES Region und somit den Export viraler Transkripte ¹⁴¹. Der Nachteil dieser Moleküle liegt in der Wechselwirkung mit zellulären Proteinen, die für andere Zellfunktionen essentiell sein können, dadurch sehr oft cytotoxisch wirken und daher für den Einsatz in klinischen Studien ungeeignet sind.

Eine weitere Alternative ist Pyronin Y, ein interkalierender Farbstoff, der den Rev-RRE-Komplex *in vitro* blockiert. Weitere interkalierende Agenzien, die zum Beispiel die Rev-RRE Interaktion durch konformationelle Veränderung im RRE stören, wurden ebenfalls untersucht. Der Nachteil dieser Wirkstoffe liegt in ihrer Eigenschaft unspezifisch in die DNA zu interkalieren und eventuell zur Apoptose der Zellen zu führen ¹³³.

Bei den Protein-basierenden Strategien wurde bereits der Einsatz der Mutante (Sam68 Δ C) des zellulären Proteins Sam68 als möglicher Therapieansatz beschrieben. Zelluläre Proteine eignen sich als potentielle Ziele einer Gentherapie, da sie im Gegensatz zu viralen Proteinen mit dem Problem der Resistenzentwicklung nicht konfrontiert sind und möglicherweise eine bessere Verträglichkeit und geringere Immunogenität ausweisen.

1.4 Das zelluläre Protein Sam68

Im Jahre 1994 identifizierten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Sam68 als Substrat der Src-Kinase während der Mitose, welches an seinen Tyr-Resten phosphoryliert wird, und benannten es als *src-associated in mitosis 68 kDa* (Sam68) ^{142,143}. Neben seiner Fähigkeit zur RNA-Bindung, geht es auch zahlreiche Interaktionen mit Proteinen ein und

erfüllt eine Rolle als Adapterprotein. Somit wurde es der Gruppe der STAR-Proteine (*signal transduction and activation of RNA*) zugeordnet ¹⁴⁴. Die RNA-Bindeaktivität dieser Proteine wird durch posttranslationale Modifikationen, Regulation der intrazellulären Lokalisation und Zugänglichkeit zu RNA-Molekülen reguliert.

1.4.1 Struktur

Sam68 besteht aus 443 Aminosäuren und ist ein 48.2 kDa großes Protein; sein Molekulargewicht in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) liegt bei 68 kDa. Bisher war es noch nicht möglich seine Tertiärstruktur aufzulösen. Die Organisation des Proteins ist in Abbildung 1.8 dargestellt.

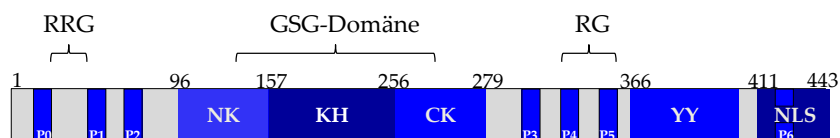


Abb. 1.8: Funktionelle Domänen von Sam68.

Das Protein besitzt eine zentrale GSG-Domäne, die aus der RNA-bindenden KH-Domäne und den flankierenden N- und C-terminalen Segmenten besteht. Die Bindung der SH3-Domänen erfolgt über die Prolin-reichen Regionen (P0-P6); SH2-Domänen werden in der Tyrosin-reichen C-terminalen Region gebunden (YY). RG/RGG: Arginin-Glycin-reiche Region; NLS: Kernlokalisierungssignal.

Die RNA-Bindung erfolgt über die KH-Domäne, die von zwei konservierten Sequenzen, der N-terminalen (NK)- und C-terminalen (CK)-Region, flankiert wird ¹⁴⁵. Dieser gesamte Bereich vermittelt die RNA-Bindenspezifität und wird als GSG-Domäne bezeichnet ¹⁴⁶. Sam68 bindet mit hoher Affinität an poly(U)- und poly(A)-Sequenzen ¹⁴⁷. Insbesondere UAAA und UUUU Motive wurden als hochaffine RNA-Targets identifiziert ¹⁴⁸. *In vivo*-Bindungsstudien zeigen, dass unter anderem die mRNAs des heterogenen Ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1) und β -Actin mit den Sequenzmotiven UAAA- bzw. UUUUUU zelluläre Ziele von Sam68 sind ¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Darüber hinaus oligomerisiert Sam68 nur in Anwesenheit von RNA-Molekülen über die KH-Domäne, kann aber auch Heterooligomere mit anderen Proteinen der STAR-Familie ausbilden ¹⁴⁵.

Neben der KH-Domäne besitzt Sam68 sieben Prolin-reiche Regionen mit einem zentralem PxxP-Motiv; diese werden mit P0-P6 bezeichnet. P0-P2 befinden sich im N-terminalen Bereich, P3-P6 in der C-terminalen Region. Diese PxxP-Motive sind potentielle Liganden für SH3-Domänen ¹⁵². Unter anderem binden die Tyrosin-Kinasen Src, Fyn, Lck, Sik/BRK, PLC γ -1 oder Grb-2 über die SH3-Domänen an Sam68 und sind wichtig für dessen Tyrosin-

Phosphorylierung, wodurch die RNA-Bindeaffinität gesenkt wird ^{144,153-158}. Zahlreiche Oberflächenrezeptoren wie beispielsweise der Insulin-, Leptin- oder T-Zell-Rezeptor rekrutieren nach Stimulierung Rezeptor-assoziierte Kinasen, die über SH3-Domänen mit dem Protein wechselwirken ¹⁵⁹⁻¹⁶³. Die Tyrosin-reiche Sequenz im C-Terminus von Sam68, die eine Phosphorylierung unter anderem durch die Src-Kinasen ermöglicht, erlaubt über SH2-Domänen die Bindung weiterer Adapterproteine und Signaltransduktionsproteine (Phospholipase C γ -1, Ras-GAP, Grb-2) ^{156,157,163,164}. Aufgrund dieser Wechselwirkungen mit anderen zellulären Proteinen liegt die Vermutung nahe, dass Sam68 die Rolle eines Adapterproteins im Zellmetabolismus einnimmt ^{156,165}.

Sam68 weist nicht nur eine Tyrosin-Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation auf, seine Arginine in den RG-reichen Regionen können infolge der Interaktion mit Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) ebenfalls methyliert werden ¹⁶⁶. Dieser Prozess ist irreversibel, beeinflusst aber die RNA-Bindesepezifität des Proteins nicht. Eher handelt es sich um einen Reifungsprozess, der die zelluläre Lokalisation steuert, da hypomethyliertes Sam68 hauptsächlich im Cytoplasma, methyliertes Sam68 hingegen im Zellkern zu finden ist ¹⁶⁷. Desweiteren kann Sam68 an Lysin-Resten acetyliert werden und dadurch seine RNA-Bindesepezifität erhöhen ¹⁶⁸. Eine Sumoylierung an Lysin 96 verändert die Funktionen von Sam68 innerhalb des Zellzyklus, indem sie die Fähigkeit des Proteins die Apoptose einzuleiten hemmt ¹⁶⁹.

Am C-Terminus besitzt Sam68 eine Kernlokalisationssequenz (NLS) und wird daher überwiegend im Zellkern gefunden ¹⁷⁰. Es wurde vor allem in Tumorzellen beobachtet, dass es dort zusammen mit anderen Sam68-homologen Proteinen und RNA-Molekülen in sog. *Sam68 nuclear bodies* (SNBs) - das sind distinkte Bereiche im Zellkern, die sich von anderen nucleären Strukturen unterscheiden - akkumuliert ¹⁷¹.

1.4.2 Funktion

Eine Übersicht über die verschiedenen Funktionen des Proteins liefert Abbildung 1.9.

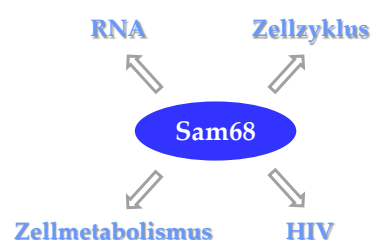


Abb. 1.9: Zusammenfassung der Sam68-Funktionen. Erläuterungen siehe Text.

Sam68 wird eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus zugeschrieben. Seine Funktion während der Meiose wurde in der murinen Spermatogenese untersucht ¹⁷². Männliche Sam68 *Knockout*-Mäuse haben eine gestörte Spermatogenese und sind infertil, da die Expression wichtiger mRNAs beeinträchtigt ist. In Spermatozyten bindet Sam68 an bestimmte mRNAs, die im Cytoplasma zum Zeitpunkt der Translation gelagert werden. Während der meiotischen Teilung ist Sam68 mit solchen polyadenylierten mRNAs assoziiert und unterstützt die Translation ¹⁷³. Seine Beteiligung an der Mitose wird kontrovers diskutiert. Einerseits soll die Überexpression von Sam68 zu einem Arrest in der G₁-Phase aufgrund der Herunterregulierung von Cyclin D1 und E führen ¹⁷⁴. Andererseits soll es den Übergang von G₁- zur S-Phase fördern ¹⁷⁵. Desweiteren wurde berichtet, dass eine Reduktion der Sam68-Expression eine Verlängerung des Übergangs von der G₂- in die M-Phase zur Folge hat ¹⁷⁶.

Sam68 ist aufgrund seiner vielfältigen Funktionen auch entscheidend für den Zellmetabolismus. In diesem Zusammenhang ermöglicht es als Adapterprotein Protein-Protein-Interaktionen und ist somit an vielen Signaltransduktionswegen beteiligt. Unter anderem führt die durch Stimulation des Leptin-Rezeptors ausgelöste Tyrosin-Phosphorylierung von Sam68 in PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) zur Wechselwirkung mit Signalmolekülen, die in den JAK/STAT-Signalweg involviert sind ¹⁶³. Aktiviert durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors (*TCR*) unterstützt Sam68 die Bildung eines Signalkomplexes mit verschiedenen Adapterproteinen, die das TCR-Signal weiterleiten ¹⁶⁵. Auch spielt es eine Rolle im Insulin-vermittelten Signalweg ¹⁶².

Zudem ist Sam68 aufgrund seiner RNA-bindenden Eigenschaften am RNA-Metabolismus beteiligt. Es gibt Hinweise, dass es mit der Spleißmaschinerie interagiert und die Auswahl der Spleißstellen oder die 3'-Endprozessierung der RNA beeinflusst ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Nicht zu vergessen sind in diesem Kontext auch seine posttranslationalen Modifikationen, die die RNA-Bindesepezifität verändern können.

Die Funktion von Sam68 im HI-viralen Kontext wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Eine direkte Interaktion der beiden Proteine Rev und Sam68 konnte bestätigt werden ¹⁸⁰. Ebenso wurde gezeigt, dass Sam68 in der Lage ist die Rev-Funktion funktionell zu ersetzen ¹⁸¹. Dabei wurde berichtet, dass es auch den RNA-Export anderer Retroviren unterstützt bzw. ersetzt ¹⁸². Ob Sam68 seinen Exporteinfluss ebenfalls wie Rev über den CRM-1-abhängigen Weg ausübt, bleibt umstritten ^{181,183}. Es wurde auch gezeigt, dass Sam68,

RHA (RNA Helikase A) und Tap beim nucleären Export CTE (*constitutive transport element*)- und RRE-haltiger RNA zusammenspielen ¹⁸⁴. Eine direkte Interaktion von Sam68 mit dem RRE- oder CTE-Element konnte wenig später wiederum nicht bestätigt werden; daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass es vielleicht mit anderen Elementen intronhaltiger Reporter-RNAs interagiert ¹⁸⁵. Auf jeden Fall scheint eine exogene Expression von Sam68 in Astrozyten, deren endogener Sam68-Level vergleichsweise gering ist, die dort gestörte Rev-Funktion teilweise wiederherzustellen ¹⁸⁶. Die Herunterregulierung von Sam68 mittels RNAi führte zu einer drastischen Hemmung der Rev-RRE-vermittelten Genexpression und der HIV Produktion ¹⁸⁷. Es wurde auch eine dominant negative Mutante von Sam68 (Sam68 Δ C) in Bezug auf die HIV-Replikation beschrieben, der das Kernlokalisierungssignal fehlt, so dass sie ausschliesslich im Cytoplasma vorliegt. Sam68 Δ C verursacht eine perinucleäre Anhäufung ungespleißter, viraler Transkripte und hält somit die Rev-abhängige RNA vom Translationsapparat fern ¹⁸⁸. So hemmt sie die Translation dieser RNA-Spezies, welche Rev-abhängig aus dem Zellkern exportiert wurden. Diese perinucleären Strukturen wurden wenig später als Stressgranula identifiziert, welche durch oxidativen Stress verursacht werden. Daraufhin akkumuliert Sam68 in diesen Granula ¹⁸⁹. Desweiteren können Sam68 Δ C-Mutanten die Ausbildung dieser Stressgranula hervorrufen und sogar die HIV-1-Nef Translation durch Translokation der Nef-mRNA in die Stressgranula hemmen ¹⁹⁰. Im Gegensatz dazu wurde postuliert, dass der negative Effekt nicht auf die Translokation der viralen RNA zurückzuführen sei, sondern mit einer Veränderung der Zusammensetzung des mRNPs einhergeht. Die Hemmung der Translationseffizienz wird durch eine Reduktion der PABP1-Bindung mit den mRNAs verursacht ¹⁹¹. Die Präsenz einer zusätzlichen Region in Sam68 (AS 269-321) ist für den transdominant negativen Effekt der Sam68 Δ C-Mutante Voraussetzung ¹⁹². Wird dieser Bereich deletiert, so hebt sich der Effekt wieder auf. Zudem soll Sam68 an der 3'-Endprozessierung und der cytoplasmatischen Verwendung der HIV-RNA beteiligt sein und somit die Expression der HIV-1 Gene steigern ^{178,193}. Nimmt man all diese Erkenntnisse zusammen, lässt sich feststellen, dass Sam68 ein essentieller, zellulärer Cofaktor der HIV-Replikation ist ¹⁹⁴.

1.5 Phagen-Display

Zur Identifikation neuer Protein-Interaktionspartner oder Verbesserung der Bindungsaffinität einer bestehenden Interaktion (z.B. Rev-Sam68) ist sehr oft aufgrund der einfachen Handhabung das Phagen-Display die Methode der ersten Wahl.

1.5.1 Biologie des filamentösen Bakteriophagen M13

Bakteriophagen gehören zu einer Virusfamilie, die insbesondere gram-negative Bakterien infizieren. Anders als bei den meisten bakteriellen Viren, werden filamentöse Phagen in Bakterien produziert und ausgeschieden, ohne dass die Bakterienzelle getötet oder lysiert wird ¹⁹⁵. Ein Phagenpartikel hat einen Durchmesser von ca. 5 nm, seine Länge hängt von der Größe des Genoms ab (Abb. 1.10). Im Falle des M13-Phagen ist die 6400 Nucleotid-große DNA in einen Partikel von ~1000 nm verpackt ¹⁹⁶. Dieser ist aus fünf Strukturproteinen aufgebaut. Das Hauptoberflächenprotein p8 liegt in ca. 2700 Kopien helixförmig vor und umgibt die einzelsträngige DNA ^{197,198}. Das Assemblierungsende des Phagen besteht aus je 3-5 Kopien des p7- und p9-Proteins (beide sind wichtig für die Partikelbildung), wohingegen das Adsorptionseende aus je 5 Kopien des p3- und p6-Proteins gebildet wird, welche zuständig für die Freisetzung der Phagenpartikel sind. Das N-terminale Ende von p3 steuert zudem die Infektiosität des Phagen ^{195,199}.

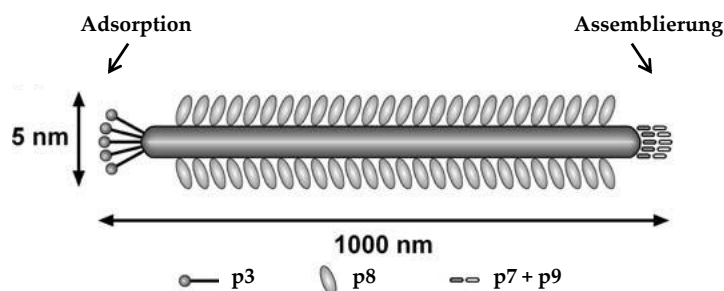


Abb. 1.10: Schematischer Aufbau des Bakteriophagen M13 (verändert nach ²⁰⁰).

Der Infektionszyklus beginnt mit dem Andocken des p3-Proteins an die F-Pili des Bakteriums ²⁰¹ (zur Übersicht Russel *et al.*, 2004 ¹⁹⁵). Eine effiziente Infektion erfolgt bei Temperaturen über 34°C; nur dann werden die F-Pili ausgebildet. Durch die Interaktion des p3 mit den F-Pili, welche ihrerseits mit dem TolQ, R, A-Rezeptorkomplex in der bakteriellen Membran verbunden sind, wird das Phagen-Genom in das bakterielle Cytoplasma eingeschleust ^{202,203}. Dort wird die ssDNA des Phagen durch die bakteriellen RNA- und DNA-Polymerasen und die Topoisomerase in ein doppelsträngiges, *super-coiled* Molekül

(replikative Form, RF) übersetzt. Der (+)-Strang wird durch das Protein p2 am Replikationsursprung gespalten und das 3'-Ende durch die bakterielle DNA-Polymerase III mit dem (-)-Strang als *template* elongiert. Nach einer Replikationsrunde wird der (+)-Strang mit Hilfe des p2 rezirkularisiert und wieder in die replikative Form gebracht. Die Vervielfältigung der ssDNA erfolgt nach dem *rolling circle*-Mechanismus. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei das p5-Protein, welches kooperativ an die neu synthetisierten (+)-Stränge bindet und die Phagenassemblierung ermöglicht ²⁰⁴. Die Assemblierungsstelle an der Membran besteht aus den drei für die Morphogenese zuständigen Proteinen p1, p11 und p4. p1 und p11 sind an der Membran lokalisiert, während p4 die Pore, über welche der Partikel die Zelle verlässt, ausbildet. Die Initiation wird nur eingeleitet, wenn die Assemblierungsstelle, die zwei Strukturproteine p7 und p9, welche an das Verpackungssignal der DNA binden, und die ssDNA präsent sind ²⁰⁵. Während der Elongation werden die p5-Proteinuntereinheiten durch p8 ersetzt und die DNA durch die Membran transloziert. Dieser Prozess bleibt so lange bestehen, bis die virale DNA durch das p8 eingehüllt ist. Zuletzt werden die in die Membran eingebetteten Proteine p3 und p6 an das terminale Ende des entstehenden Phagenpartikels angefügt ¹⁹⁹.

1.5.2 Phagen-Display

Das Phagen-Display ist eine *in vitro*-Selektionstechnik, bei der Peptide an die Strukturproteine des Phagen fusioniert und somit auf der Oberfläche des Partikels abgebildet werden ²⁰⁶. Die Sequenz für das Fusionsprotein liegt dabei im Genom des Phagen vor. Somit wird eine Kopplung von Geno- und Phänotyp erreicht, die es nach der Selektion ermöglicht, auf die codierende Sequenz zurückzugreifen. Ausschlaggebend für diese Technik ist eine randomisierte Bibliothek und das verwendete Phagensystem. Eine schematische Übersicht über den Zyklus des Phagen-Displays ist im Kapitel 3.3.3 gegeben.

Für die Abbildung des Peptids stehen zwei unterschiedliche Vektorsysteme zur Verfügung (zur Übersicht Lowman *et al.*, 1997 ²⁰⁷). Einerseits kann ein Phagen-Vektor verwendet werden, der auf der natürlichen Ff-Phagensequenz basiert. Andererseits können Phagemid-Vektoren herangezogen werden, die nur das Fusionsprodukt aus Peptid- und Hüllprotein codieren. Diese zeichnen sich im Gegensatz zu den großen Phagen-Vektoren durch ihre geringe Größe und einfache Handhabung aus. Bei Phagen-Vektoren wird die heterologe Sequenz für das Display direkt in die codierende Sequenz des Hüllproteins inseriert, so dass

alle Kopien des Hüllproteins das heterologe Protein abbilden. Die Peptid-Hüllprotein-Fusion wird in Phagemiden in ein kleines Plasmid unter einem schwachen Promotor kloniert, der zusätzlich zum eigenen Origin einen Ff-Origin zur Produktion einzelsträngiger DNA und nachfolgender Verpackung in Partikel enthält. Alle weiteren Wildtypproteine, die der Phage benötigt, werden auf einem gesonderten Vektor - dem Helferphagen (Stamm M13K07) - codiert, wobei sich dieser vom Wildtyp Phagen nur durch einen veränderten Replikationsursprung und somit ineffizienter Replikation und Verpackung unterscheidet. Infizierte Zellen produzieren Phagenpartikel, die neben den Wildtypproteinen des Helferphagen auch das Fusionsprotein des Phagemids auf der Oberfläche abbilden ¹⁹⁸. Ein weiterer Helferphage - der Hyperphage - ermöglicht im Gegensatz zum herkömmlichen Helferphagen ausschliesslich die Präsentation des Fusionsproteins aufgrund einer Deletion der codierenden Sequenz für das Wildtyp Protein ²⁰⁸. Je nach Fragestellung kann auf zwei Systeme zurückgegriffen werden (Tabelle 1.1). Beim polyvalenten Display wird das Peptid an das p8-Protein fusioniert, welches sich durch viele Kopien auf der Phagenoberfläche auszeichnet. Wichtige Faktoren, die hierbei beachtet werden müssen sind die Größe, Faltung und AS-Zusammensetzung des Peptids. Das polyvalente Display zeichnet sich durch eine hohe Anzahl positiver Binder mit einer mäßigen Bindungsaffinität aus. Das monovalente Display verwendet das p3-Protein für die Fusion, welches nur in 5 Kopien vorliegt. Abhängig vom verwendeten Helferphagen wird im p3-System entweder nur das Fusionsprodukt Peptid-p3 präsentiert (Hyperphage), oder es wird in 10 % der Fälle nur eine Kopie des Fusionsprodukts präsentiert und die Mehrheit an Oberflächenproteinen vom Wildtyp p3 gebildet (M13K07) ¹⁹⁵. Hier wird meist ein geringer Prozentsatz hochaffiner Binder selektioniert. Im direkten Vergleich beider Systeme dominiert die Affinität im monovalenten und die Avidität im polyvalenten Display.

Monovalent (p3)		Polyvalent (p8)
p3: 5 Kopien		p8: ~2700 Kopien
Helferphagen		
Hyperphage	M13K07	M13K07
Selektion hochaffiner Binder		Selektion mäßig affiner Binder
10-20 % spezifische Binder		70-90 % spezifische Binder
Geringe unspezifische Bindung		Höhere unspezifische Bindung
Affinität		Avidität

Tabelle 1.1: Gegenüberstellung monovalentes und polyvalentes Display ^{195,209,210}. Erläuterungen siehe Text.

Für das Bio-Panning wird der potentielle Interaktionspartner an einer festen Trägermatrix immobilisiert und anschliessend mit der Phagen-Bibliothek inkubiert. Ungebundene Phagen werden durch intensives Waschen entfernt, gebundene Phagen werden isoliert, in *E.coli* amplifiziert und in eine neue Panning-Runde eingesetzt. Nach Erreichen einer gewissen Bindungsaffinität, kann die Sequenz höher affiner Kandidaten bestimmt und die Interaktion weiter analysiert werden ²⁰⁹.

Das Phagen-Display wird v.a. zur Affinitätsreifung, Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen und Herstellung rekombinanter Antikörper herangezogen. Neben dieser äußerst effizienten und kostengünstigen Technologie, werden unter anderem zwei weitere *in vitro*-Display-Systeme verwendet, das Ribosomen-Display und das mRNA-Display ²¹¹. Eine *in vivo*-Methode stellt das *Yeast-two-hybrid* System dar ²¹².

1.6 Zielsetzung

Das HI-Virus ist während seines Replikationszyklus auf die Zusammenarbeit mit zellulären Cofaktoren angewiesen. Hierbei spielt das Protein Sam68 eine wichtige Rolle, das als direkter Interaktionspartner von Rev am viralen RNA-Metabolismus beteiligt ist. Ein Eingriff in die bestehende Rev/Sam68-Interaktion mit höher affinen Rev- bzw. Sam68-basierten Peptiden könnte einerseits Rückschlüsse auf die Rolle von Sam68 beim RNA-Metabolismus von HIV-1 erlauben, andererseits einen Ansatz für neue Therapiekonzepte gegen zelluläre Targets liefern.

Hierfür sollten zunächst die für die Interaktion verantwortlichen Regionen in beiden Proteinen durch Konstruktion von Deletionsmutanten und deren Charakterisierung in Interaktionsanalysen identifiziert werden. Desweiteren sollten die Funktionalität dieser Deletionsmutanten und ihr Einfluss auf die HIV-1-Replikation untersucht werden. Ausgehend von der Kenntnis der interagierenden Bereiche sollte eine Rev- oder Sam68-Varianten-Bibliothek generiert werden, um daraus mittels Phagen-Display-Technologie höher affine Kandidaten zu selektionieren, die als potentielle Inhibitoren der HIV-Replikation dienen könnten.

2. Zusammenfassung

Die Suche nach neuen Strategien und Zielen für die Therapie von HIV-Infektionen konzentriert sich zunehmend auf zelluläre Faktoren, die für die Replikation des Virus unverzichtbar sind und nicht der hohen Variabilität der HI-Viren selbst unterliegen. Zu den für die HIV-Replikation essentiellen, zellulären Cofaktoren zählt auch das Protein Sam68, welches direkt mit dem viralen Exportfaktor Rev interagiert. Die funktionelle Rolle von Sam68 im HI-viralen RNA-Metabolismus wird kontrovers diskutiert.

Die Entwicklung potenter, transdominanter Inhibitoren der Rev/Sam68-Interaktion könnte die Frage beantworten, ob ein therapeutischer Eingriff auf der Ebene dieser Interaktion überhaupt möglich ist.

Hierfür wurden zunächst die an der Interaktion beteiligten Domänen mit Hilfe von Deletionsmutanten des Sam68- und Rev-Proteins identifiziert. Die Analyse der Interaktion wurde sowohl im zellfreien (*in vitro*), als auch im zellulären System in eukaryotischen Zellkulturen (*in vivo*) durchgeführt. Dabei konnte die Sam68-Bindedomäne im Rev-Protein auf ein strukturelles Motiv bestehend aus den Regionen AS 18-24, AS 54-60 und AS 64-116 eingeschränkt werden. Die Kristallstruktur des Rev-Proteins und Modellvorstellungen hinsichtlich der Rev-Oligomerisierung verdeutlichen, dass die Sam68-Interaktionsstellen in Rev zum Teil in den für die Oligomerisierung wichtigen Bereichen (AS 18-24 und AS 54-60) und der C-terminalen Region (AS 64-116) des Proteins liegen. Möglicherweise ist Sam68 also ein zellulärer Cofaktor des Rev-Proteins, welcher unter anderem die Ausbildung eines höher geordneten Rev-Oligomers unterstützt. Das Fehlen funktionell essentieller Regionen und Bereiche der zusammengesetzten Sam68-Bindestelle schränkte die Funktionalität der Rev-Deletionsmutanten erwartungsgemäß soweit ein, dass sie nicht mehr in der Lage waren ein Reporterkonstrukt im quasi-lentiviralen System zu aktivieren und desweiteren eine gestörte Oligomerisierung in FRET-Analysen zeigten. Jedoch konnte überexprimiertes Sam68 die gestörte Exportfunktion von Rev partiell ersetzen. Die Rev-Deletionsmutanten wurden im proviralen Kontext untersucht, ob sie als kompetitiver Inhibitor das Wildtyp Rev-Protein und dadurch die Virusproduktion hemmen konnten. Ein solcher transdominant negativer Phänotyp wurde aber nicht beobachtet. Desweiteren zeigten alle Rev-Deletionsmutanten ein im Vergleich zum Wildtyp verändertes Lokalisationsmuster in der Zelle.

Die genaue Eingrenzung der Rev-Bindedomäne in Sam68 ist in der Literatur umstritten. In dieser Arbeit konnte die Rev-Bindedomäne auf das lineare, Tyrosin-reiche Motiv AS 364-410 im C-Terminus eingegrenzt werden. Der in der Literatur beschriebene synergistische Effekt von Sam68 auf den Rev-abhängigen Export konnte in dieser Arbeit in einem quasi-lentiviralen Reportersystem nicht beobachtet werden. Die Überexpression von Sam68 im proviralen Kontext zeigte jedoch Variationen bezüglich des Synergieeffekts mit Rev, die eventuell auf unterschiedlichen Gebrauch von Reporterkonstrukten und/oder Assay-Bedingungen zurückzuführen sind. Desweiteren konnte eine Region (AS 321-330) in Sam68 identifiziert werden, deren Präsenz vermutlich essentiell für den inhibitorischen Effekt der transdominant negativen Sam68 Δ 330-443-Mutante ist. Die Deletion der Rev-Bindedomäne in den Sam68-Deletionsmutanten zeigte in dieser Arbeit sowohl im Reportersystem als auch im proviralen Kontext keinen Einfluss auf den Rev-abhängigen RNA-Export bzw. die Virusproduktion. Möglicherweise wird die Funktion des endogenen Sam68 durch die Überexpression dieser Deletionsmutanten nicht beeinträchtigt, so dass dieses die Rev-Funktion als zellulärer Cofaktor unterstützen könnte. Dafür spricht, dass nur der Wildtyp und eine Mutante mit einer intakten Rev-Bindestelle nach Herunterregulierung der Virusproduktion durch eine Sam68 Δ C-Mutante, den dominant-negativen Effekt komplementieren konnten.

Basierend auf den Interaktionsanalysen wurde die lineare Region der Aminosäuren 364-410 in Sam68 einer Zufallsmutagenese zur Generierung einer Bibliothek unterzogen. Im anschließenden Bio-Panning wurde mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie ein Kandidat selektioniert, der im Phagen-ELISA im Vergleich zum Ausgangskonstrukt eine höhere Affinität zu Rev zeigte. Die Analyse der Bindung des isolierten Kandidaten GXI zeigte jedoch im zellfreien System (*in vitro*) im Vergleich zum Wildtyp nur eine schwache bzw. im zellulären System in eukaryotischen Zellkulturen (*in vivo*) keine Interaktion mit Rev. Der Grund für diese Diskrepanz ist unklar.

Durch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Rev/Sam68-Interaktion beteiligten Domänen konnte diese Arbeit zum besseren Verständnis der Rolle von Sam68 als essentieller, zellulärer Cofaktor der HIV-Replikation beitragen. Ein Eingriff auf dieser Ebene würde daher einen möglichen Ansatzpunkt für eine potentielle HIV-Therapie liefern.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Charakterisierung der Sam68-Bindestelle im Rev-Protein

Für eine gezielte Affinitätsreifung der Sam68-Bindestelle im Rev-Protein sollte diese zunächst auf eine möglichst kleine Region eingeschränkt werden. Dazu wurden Rev-Deletionsmutanten konstruiert, die in Interaktionsstudien auf ihre Interaktion mit Sam68 analysiert wurden. Desweiteren ist die funktionelle Analyse der Mutanten sehr wichtig, da diese Deletionen auch die Funktionalität beeinträchtigen könnten. Hierfür sollten die typischen Eigenschaften und Funktionen des Rev-Proteins, die Oligomerisierung und Exportfähigkeit, untersucht werden. Zusätzlich sollte - im Hinblick auf einen transdominant negativen Phänotyp - der Einfluss der Deletionsmutanten auf die HI-virale Replikation und ihre subzelluläre Lokalisation untersucht werden.

3.1.1 Generierung von Rev-Deletionsmutanten

Wie in der Einleitung beschrieben (1.2.2), bildet das Rev-Protein eine komplexe, dreidimensionale Helix-loop-Helix-Struktur aus, bei der die beiden Oligomerisierungsdomänen mit der dazwischen liegenden RRE-Bindestelle räumlich gesehen nebeneinander liegen und durch intramolekulare, hydrophobe Kräfte stabilisiert werden.

Zur Eingrenzung der Sam68-Bindestelle erfolgte eine Struktur-basierte Konstruktion von fünf Deletionsmutanten des Rev-Proteins, die im Folgenden beschrieben werden (Abb. 3.1). Die Deletionsmutante Rev Δ 1-34 entstand durch Deletion der ersten 34 Aminosäuren des N-Terminus und wurde bereits in eigenen Vorarbeiten erstellt und analysiert¹⁸⁰. Sie zeichnet sich durch das Fehlen der funktionell wichtigen, ersten Oligomerisierungsdomäne aus.

Die Rev Δ 18-24-Mutante wurde basierend auf den Veröffentlichungen von Jeong *et al.* konstruiert²¹³. Die Deletion dieser Aminosäuren in der ersten Oligomerisierungsdomäne resultierte in einem völlig neuen Phänotyp hinsichtlich der Rev-Funktion. Obwohl die Bindung der Rev Δ 18-24-Mutante an RRE-haltige RNA und ihre Fähigkeit zur Oligomerisierung nicht gestört war, desweiteren ihre nucleäre Verteilung dem Wildtyp Rev entsprach, zeigte diese Mutante in Analysen mit einem *gag*-RRE-Reporterkonstrukt lediglich

eine verminderte Transaktivierung, die in einer Reduktion der Gag-Expression resultierte. Jeong *et al.* schlussfolgerten, dass dieser Bereich ein essentieller Bestandteil einer aus den beiden Oligomerisierungsdomänen kombinierten, hydrophoben Oberfläche sei, die als potentielle intermolekulare Bindestelle großteils für zelluläre Proteine dienen könnte. Diese Oberfläche entsteht durch die Ausbildung einer Helix-loop-Helix-Struktur⁸¹. Somit wurden wichtige strukturgebende und teils konservierte Aminosäuren in Rev Δ 18-24 deletiert.

Rev Δ 54-60, mit einer Deletion in der zweiten Oligomerisierungsdomäne, wurde analog zu Rev Δ 18-24 erstellt. Dieser Bereich wurde basierend auf Veröffentlichungen von Brice *et al.* und Thomas *et al.* gezielt deletiert^{81,214}. Die in der Literatur beschriebene Mutante RevM7 (Deletion der AS 54-56) zeigte aufgrund ihrer strukturellen Veränderungen in der Oligomerisierungsregion eine gestörte Oligomerisierungsoberfläche²¹⁴. Desweiteren sind vor allem die Aminosäuren Ile59 und Ile60 essentiell für die Oligomerbildung des Rev-Proteins⁸¹. Diese Erkenntnisse flossen in die Konstruktion der Rev Δ 54-60 Mutante mit ein.

Die Deletionsmutante Rev Δ Double setzt sich aus den beiden Deletionen AS 18-24 und AS 54-60 zusammen. Die Deletion dieser Regionen in beiden Oligomerisierungsdomänen kann Aufschluss darüber geben, ob Sam68 eventuell über die kombinierte, hydrophobe Oberfläche, welche in der Helix-loop-Helix-Anordnung entsteht, mit Rev interagiert.

Mit der Deletionsmutante Rev Δ 64-116 sollte der C-terminale Bereich des Rev-Proteins hinsichtlich der Sam68-Bindestelle abgedeckt werden. Hierfür wurde die Region AS 64-116, deren Struktur noch nicht aufgeklärt wurde, im C-Terminus entfernt.

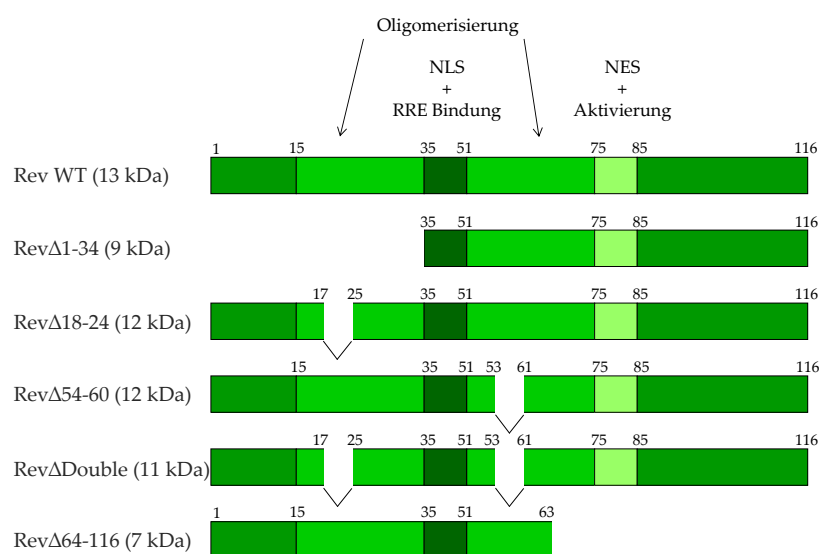


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Ausgangskonstrukts Rev WT (Wildtyp) und der fünf Rev-Deletionsmutanten.

Die funktionellen Domänen sind in der Abbildung gekennzeichnet; Oligomerisierung: Regionen, die für die

Aggregation des Proteins wichtig sind; NLS: *nuclear localization signal*; RRE Bindung: Bindestelle der viralen RRE (*rev-responsive element*)-mRNA; NES: *nuclear export signal*; Aktivierung: Region für die Interaktion mit zellulären Proteinen.

Ausgehend von der Wildtyp-Sequenz des Rev-Proteins wurden die fünf Deletionsmutanten wie in Abbildung 3.1 hergestellt. Das für die jeweilige Mutante codierende DNA-Fragment wurde mit entsprechenden Schnittstellen konstruiert, so dass es entweder in prokaryotische oder in eukaryotische Expressionsplasmide kloniert werden konnte. Die Klonierungsstrategie und die verwendeten Oligonucleotide für die entsprechenden Konstrukte sind in den Kapiteln 5.6 und 6.2.2.1 bzw. 6.2.2.2 beschrieben.

3.1.2 Co-Immunopräzipitation zur Analyse der Rev/Sam68-Interaktion *in vivo*

Für *in vivo*-Analysen der Rev/Sam68-Interaktion zur Identifikation der Sam68-Bindestelle in Rev wurden die in 3.1.1 beschriebenen Konstrukte in eukaryotischen Expressionsplasmiden mit molekularen Markern, sog. *tags* versehen. Da nicht alle Antikörper für eine Co-Immunopräzipitation geeignet sind, sollte das Anfügen eines N-terminalen CFP (cyanfluoreszierendes Protein)-*tags* (28 kDa) für Rev bzw. für die Rev-Deletionsmutanten und eines HA (Hämagglutinin)-*tags* (1 kDa) für Sam68 die Auswahl der Antikörper erleichtern. Die Klonierungsstrategie ist in 6.2.2.2 beschrieben.

Zur Expression wurden die Plasmide pcHA-Sam68 jeweils mit pECFP-Rev, pECFP-Rev Δ 1-34, pECFP-Rev Δ 18-24, pECFP-Rev Δ 54-60, pECFP-Rev Δ Double, pECFP-Rev Δ 64-116 in einem Verhältnis von 1:1 in 293T-Zellen transfiziert (6.5.1). Als Kontrolle wurde pECFP-Rev mit einem Leervektor pcDNA3.1(+) ebenfalls im Verhältniss 1:1 kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und je 100 μ g Gesamtprotein von jedem Ansatz elektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschliessend mittels Western Blot auf Expression der Konstrukte mit α -HA- oder α -CFP-spezifischen Antikörpern analysiert (5.8).

HA-Sam68 konnte in den Transfektionsansätzen auf einer Höhe von ~68 kDa detektiert werden (Abb. 3.2a, Spuren 2-7), CFP-Rev bei ~41 kDa (Abb. 3.2a, Spuren 1-2). Die CFP-Rev Mutanten liefen je nach Größe des deletierten Bereichs zwischen 35 kDa und 40 kDa (Abb. 3.2a, Spuren 3-7). Somit wurden alle Mutanten erwartungsgemäß exprimiert.

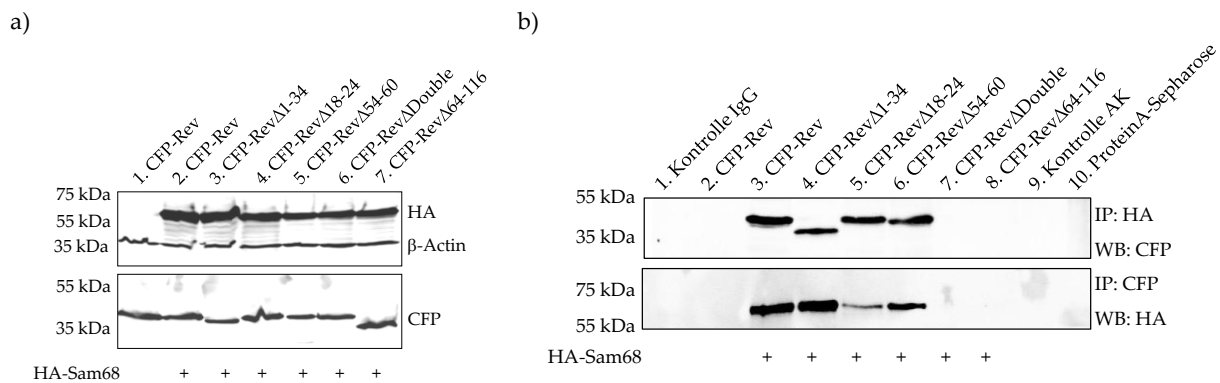


Abb. 3.2: Analyse der Rev/Sam68-Interaktion *in vivo*.

a) Expressionsnachweis des exogen exprimierten HA-Sam68, des CFP-Rev bzw. der CFP-Rev Deletionsmutanten mittels Western Blot-Analyse.

293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für CFP-Rev und pcDNA3.1(+) (Spur 1) bzw. HA-Sam68 (Spur 2) und für die CFP-Rev-Deletionsmutanten und HA-Sam68 (Spuren 3-7) transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Expression wurde mit einem α -HA-Antikörper für HA-Sam68 oder mit einem α -CFP-Antikörper für CFP-Rev und die CFP-Rev-Deletionsmutanten analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Actin.

b) Nachweis der *in vivo*-Interaktion zwischen HA-Sam68 und CFP-Rev bzw. CFP-Rev-Deletionsmutanten mittels Co-Immunopräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse.

ProteinA-Sepharose-Beads wurden mit 2 μ g eines α -CFP-spezifischen oder α -HA-spezifischen Antikörpers inkubiert und anschliessend mit Zellysaten (500 μ g) aus transfizierten 293T-Zellen versetzt. Gebundenes HA-Sam68 bzw. CFP-Rev oder gebundene CFP-Rev-Deletionsmutanten wurden nach Co-Immunopräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

Zur *in vivo*-Analyse der Rev/Sam68-Interaktion wurde eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) durchgeführt (6.3.7). Hierzu wurden die in Abb. 3.2a analysierten Zellysate jeweils mit einem α -HA- oder analog α -CFP-spezifischen Antikörper, der vorher an ProteinA-Sepharose-Beads gebunden wurde, inkubiert. Wenn eine Interaktion stattfindet, ist es mit den Antikörpern möglich das Interaktionspaar zu präzipitieren und in einer anschließenden Western Blot-Analyse zu detektieren. Eine fehlende Interaktion bei den Rev-Deletionsmutanten liefert Aussagen über die Sam68-Bindestelle. Essentiell für die korrekte Interpretation von Co-Immunopräzipitationen ist die Wahl entsprechender Kontrollen, um Kreuzreaktionen und unspezifische, falsch-positive Signale zu erkennen. Deswegen wurden folgende Kontrollen mitgeführt: Die Kontrolle IgG (Abb. 3.2b, Spur 1) sollte eine unspezifische Bindung der Antikörper an Proteine der Lysate ausschliessen. Hierfür wurden an ProteinA-Sepharose-Beads gebundene, unspezifische IgGs (Ratte bzw. Maus) mit dem CFP-Rev- und HA-Sam68 Zellysat inkubiert. Die Kontrolle AK (Abb. 3.2b, Spur 9) zeigte eventuelle Kreuzreaktionen zwischen dem IP-Antikörper und dem WB-Antikörper. Hierfür wurde an ProteinA-Sepharose-Beads gebundener α -CFP- bzw. α -HA-Antikörper im Western Blot mit einem α -HA bzw. α -CFP-Antikörper detektiert. Desweiteren wurden unbeladene ProteinA-Sepharose-Beads (Abb. 3.2b, Spur 10) analysiert, um ein falsch-positives Signal auf

der erwarteten Laufröhre der exprimierten Konstrukte auszuschließen. Als Negativkontrolle wurde das CFP-Rev Zellysats mit den entsprechenden Antikörpern präzipitiert und detektiert (Abb. 3.2b, Spur 2). Das Lysat, in dem CFP-Rev und HA-Sam68 co-exprimiert wurden, diente in der Co-IP als Positivkontrolle für eine *in vivo*-Interaktion (Abb. 3.2b, Spur 3). Die Deletionsmutanten CFP-Rev Δ 1-34, CFP-Rev Δ 18-24 und CFP-Rev Δ 54-60 (Abb. 3.2b, Spuren 4-6) waren, trotz ihrer Deletionen in wichtigen strukturgebenden Domänen des Rev-Proteins, fähig mit HA-Sam68 zu interagieren. Die Mutanten CFP-Rev Δ Double, die beide Deletionen AS 18-24 und AS 54-60 gleichzeitig enthält, und CFP-Rev Δ 64-116, bei der der C-terminale Bereich deletiert worden ist, konnten HA-Sam68 nicht mehr binden (Abb. 3.2b, Spuren 7-8). Somit setzt sich die Sam68-Interaktionsstelle in Rev aus einem strukturellen Motiv mit drei verschiedenen Domänen (AS 18-24, AS 54-60 und AS 64-116) zusammen. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass Sam68 tatsächlich über eine kombinierte, hydrophobe Oberfläche mit dem Rev-Protein interagieren könnte (3.1.1). Eine korrekte Ausbildung der Helix-loop-Helix-Struktur ist hierfür Voraussetzung. Werden essentielle Aminosäuren (AS 18-24, AS 54-60 und AS 64-116) deletiert, so ist die strukturelle Anordnung von Rev gestört und somit auch die Interaktionsstelle. Die Deletion der Teilbereiche AS 18-24 oder AS 54-60 führte aber nicht zum Interaktionsverlust. Möglicherweise reicht in den Mutanten Rev Δ 18-24 und Rev Δ 54-60 die Anwesenheit der C-terminalen Region (AS 64-116) und eines weiteren Bereichs (AS 54-60 oder AS 18-24) zur Stabilisierung der Struktur und der Sam68-Interaktionsstelle aus.

3.1.3 Pull down-Assay zur Analyse der Rev/Sam68-Interaktion *in vitro*

Die Sam68-Bindestelle in Rev sollte ebenfalls in einem *in vitro*-System untersucht werden, um binäre Interaktionen einer Co-Komplexbildung, was mit zellulären Systemen in eukaryotischen Zellkulturen der Fall ist, gegenüber zu stellen. Hierfür wurden die Rev-Konstrukte (3.1.1) N-terminal mit einem GST (Glutathion S-Transferase)-tag (28 kDa) und C-terminal mit einem HIS (Hexa Histidin)-tag (1 kDa), dessen Sequenz mittels PCR angefügt wurde (6.2.2.1), versehen. Die N-terminale Fusion an GST erfolgte durch Klonierung der Konstrukte in das prokaryotische Expressionsplasmid pGEX-KG (5.5, 6.2.2.1). Das zu exprimierende Fusionsgen steht unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors. Somit kann gezielt durch IPTG-Zugabe die Expression des Fusionsproteins induziert werden (6.3.1). Da die Produktion von rekombinantem Sam68 im bakteriellen Expressionssystem mit niedrigen

Ausbeuten und geringer Stabilität verbunden ist, wurden gezielt rekombinant hergestelltes Rev und Rev-Deletionsmutanten als Affinitätsmatrix zur Isolierung von endogenem Sam68 aus dem Lysat der humanen Zelllinie 293T eingesetzt. Die Methode bietet darüberhinaus den Vorteil, dass Sam68 unter natürlichen Bedingungen posttranslational modifiziert werden kann (1.4.1).

Die Rev-Fusionsproteine mit *GST-tag* wurden, wie im Abschnitt 6.3.1 beschrieben, exprimiert und zunächst über die Affinitätsmatrix Glutathion-Sepharose aufgereinigt (6.3.2.1). Um sicher zu stellen, dass keine verkürzten Stopp-Varianten oder Degradationsprodukte der Proteine die Bindung an Sam68 beeinflussen, folgte zur Isolierung der Volllänge-Proteine ein weiterer Aufreinigungsschritt über die Bindung des C-terminalen *HIS-tags* an eine Ni-NTA-Agarose-Matrix (6.3.2.2). In Abbildung 3.3 sind exemplarisch die Aufreinigungsschritte von GST-Rev Δ Double-HIS dargestellt. Die Spuren 6-8 zeigen das über das *GST-tag* aufgereinigte Protein. Desweiteren sind neben einer Bande mit korrektem Molekulargewicht (40 kDa) weitere Proteine kleinerer Größe erkennbar. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um Abbauprodukte oder, wie oben erwähnt, translationale Stopp-Mutanten, die auf die für *E. coli* suboptimale HIV-Codon-Usage des *rev*-Gens zurückzuführen sind. Durch die Aufreinigung über das *HIS-tag* konnten diese grossteils effizient abgetrennt werden (Abb. 3.3, Spuren 12-13), was aber stets zu einer verringerten Gesamtausbeute der Proteine führte.

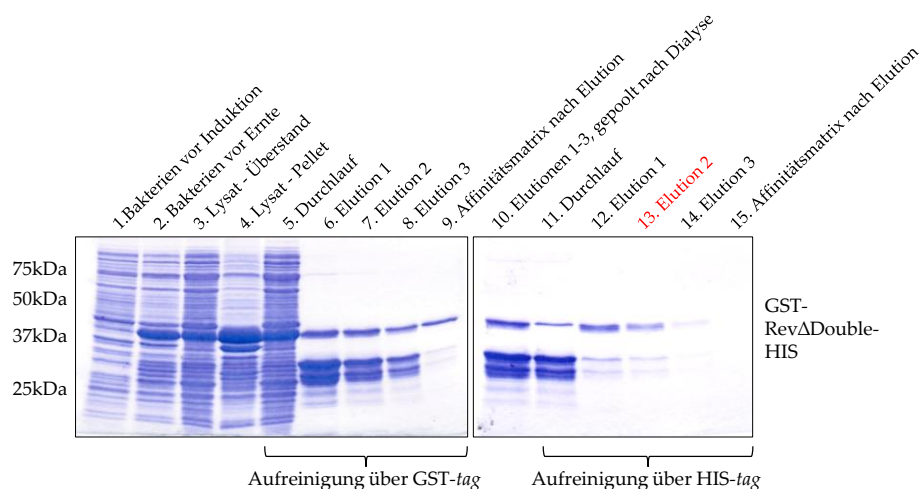


Abb. 3.3: Aufreinigungsschritte des exprimierten Fusionsproteins GST-Rev Δ Double-HIS (40 kDa).

Während der Expression- und Aufreinigungsprozedur wurden stets Aliquots zur Kontrolle der einzelnen Schritte entnommen, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Für die Expressions- und Interaktionsanalyse wurde die Elutionsfraktion 2 (rot markiert) herangezogen.

Die Identität aller aufgereinigten Fusionsproteine wurde im Western Blot verifiziert. Dabei wurden in der gegen das *GST-tag* gerichteten Detektion mit einem α -GST-Antikörper (5.8)

neben dem korrekten Protein teilweise auch die Abbauprodukte, was möglicherweise mit einer GST-Dimerisierung einhergeht, erkannt (Abb. 3.4a). Die Detektion mit dem α -HIS-Antikörper (5.8) gegen das C-terminale HIS-tag bestätigte die Aufreinigung der Volllänge-Proteine (Abb. 3.4a). Lediglich die Mutante GST-Rev Δ 64-116-HIS zeigte eine verringerte Expression. GST wurde als Negativkontrolle für den *Pull down*-Assay exprimiert und aufgereinigt.

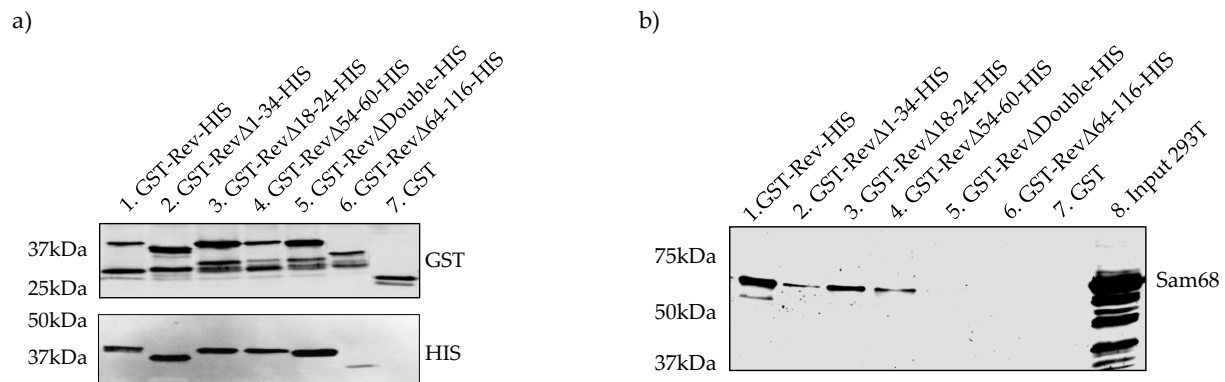


Abb. 3.4: Analyse der Rev/Sam68-Interaktion *in vitro*.

a) Expressionsnachweis der aufgereinigten Proteine.

60 μ g Gesamtprotein wurden pro Spur geladen und nach einer SDS-PAGE mit einem α -GST- oder α -HIS-Antikörper mittels einer Western Blot-Analyse detektiert.

b) Nachweis der *in vitro*-Interaktion zwischen endogen exprimiertem Sam68 und GST-Rev-HIS bzw. GST-Rev-HIS-Deletionsmutanten mittels *Pull down*-Assay und anschließender Western Blot-Analyse.

Die aufgereinigten Proteine (60 μ g) wurden an magnetische *Beads* gebunden und mit 2.5 mg Zelllysat aus 293T-Zellen inkubiert. 10 μ g direkt geladenes Zelllysat aus 293T-Zellen diente als Kontrolle der zellulären Expression von Sam68. Gebundenes Protein wurde in einer Western Blot-Analyse mit einem α -Sam68-Antikörper (5.8) detektiert.

Für die Analyse der Sam68-Bindestelle in Rev wurden, wie in 6.3.6 ausführlich beschrieben, die aufgereinigten Rev-Proteine an magnetische *Beads* gekoppelt und durch Inkubation mit Zelllysat von 293T-Zellen, die endogen Sam68 exprimieren (Abb. 3.4b, Spur 8), auf die Interaktion mit Sam68 untersucht. Wie bereits erwähnt, diente GST im *Pull down*-Assay als Negativkontrolle (Abb. 3.4b, Spur 7). GST-Rev-HIS wurde als Positivkontrolle für eine Interaktion zwischen Rev und Sam68 verwendet (Abb. 3.4b, Spur 1). Die Mutanten GST-Rev Δ 1-34-HIS, GST-Rev Δ 18-24-HIS und GST-Rev Δ 54-60-HIS zeigten eine - wenn auch schwächere - Interaktion mit Sam68 (Abb. 3.4b, Spuren 2-4). GST-Rev Δ Double-HIS und GST-Rev Δ 64-116-HIS waren aufgrund ihrer Deletionen nicht mehr fähig Sam68 zu binden (Abb. 3.4b, Spuren 5-6). Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten, die auch für einfach aufgereinigte Rev-Proteine mit N-terminaler GST-Fusion (6.2.2.1) erhalten wurden (Daten nicht gezeigt). Die Abbauprodukte und verkürzten Varianten scheinen also keinen negativen Einfluss auf die *Pull down*-Analysen zu haben. Desweiteren spiegeln die *in vitro*-Daten die

Ergebnisse der *in vivo*-Analyse (3.1.2) wieder. Die Sam68-Bindestelle in Rev setzt sich also aus den Bereichen AS 18-24, AS 54-60 und AS 64-116 zusammen und bildet ein strukturelles Motiv aus.

3.1.4 Funktionelle Charakterisierung der Rev-Deletionsmutanten

Als nächstes sollten die konstruierten Deletionsmutanten des Rev-Proteins funktionell charakterisiert werden. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit die Funktion des Rev-Proteins hinsichtlich seiner Oligomerisierungsfähigkeit (3.1.4.1) und Exportfähigkeit (3.1.4.2) durch das Fehlen funktionell essentieller Bereiche und auch der Sam68-Bindestelle beeinflusst wird. Desweiteren sollte die Auswertung einer Überexpression der Rev-Deletionsmutanten im proviralen Kontext untersucht werden (3.1.4.3), um Mutanten mit einem transdominant negativen Phänotyp zu identifizieren.

3.1.4.1 Oligomerisierung

Rev besitzt die Eigenschaft, in Anwesenheit von RRE-haltiger RNA durch Oligomerisierung zu einem höher geordneten Komplex zu aggregieren (1.2.2). Nur als Oligomer erfüllt es seine volle Funktion als Exportprotein (1.2.3). Deswegen sollte untersucht werden, ob die Deletionen, welche hauptsächlich in den beiden Oligomerisierungsdomänen des Proteins liegen, die Oligomerbildung stören. Hierfür eignet sich vor allem die FRET-Analyse, die im durchflusscytometrischen Verfahren (FACS) die Erfassung der *in vivo*-Interaktion von Proteinen ermöglicht. Vorteil dieser Methode ist, dass das Verfahren in lebenden Zellen stattfindet und somit die zellulären Kompartimente der Zelle, im Gegensatz zur Co-Immunoprecipitation, nicht zerstört werden. Die Theorie und praktische Umsetzung der FRET-Analyse wird in 6.5.3 beschrieben. Für die Analysen wurden zunächst die Rev-Konstrukte (3.1.1) aus der *in vivo*-Interaktionsstudie (3.1.2) verwendet. Als Interaktionspartner wurde das Wildtyp Rev-Protein N-terminal mit einem YFP (gelbfluoreszierendes Protein)-tag versehen (6.2.2.2). Nach Co-Transfektion der CFP-Rev Varianten mit YFP-Rev und einem pcUTR-wtgag-RRE (5.5) Konstrukt in der humanen Zelllinie 293T wurden die Proteine exprimiert. Eine stattfindende Interaktion bzw. Oligomerisierung sollte durch einen positiven FRET-Effekt mittels FACS-Analyse messbar sein. Das Konstrukt pcUTR-wtgag-RRE wurde ursprünglich für ein subgenomisches Reportersystem zur Analyse des Rev-abhängigen mRNA-Exports basierend auf dem HIV-1

Gen *gag* entwickelt (3.2.5.1) ²¹⁵. Das Gag-Protein wird Rev-abhängig in Säugerzellen exprimiert und ermöglicht durch die Präsenz der RRE-Sequenz am 3'-Ende des *gag*-Gens die Oligomerisierung von Rev. Da aber nicht einmal die Positivkontrolle, das Wildtyp Rev-Protein, einen positiven FRET-Effekt gezeigt hatte (Daten nicht gezeigt), lag die Schlussfolgerung nahe, dass die N-terminale Fusion von CFP bzw. YFP die Oligomerisierung von Rev stört. Aufgründessen wurde die Fusion des *tags* C-terminal mit einem flexiblen *linker* zwischen dem Protein und dem *tag* vorgenommen, um die Funktionalität der Fusionsproteine zu verbessern (6.2.2.2) ²¹⁶.

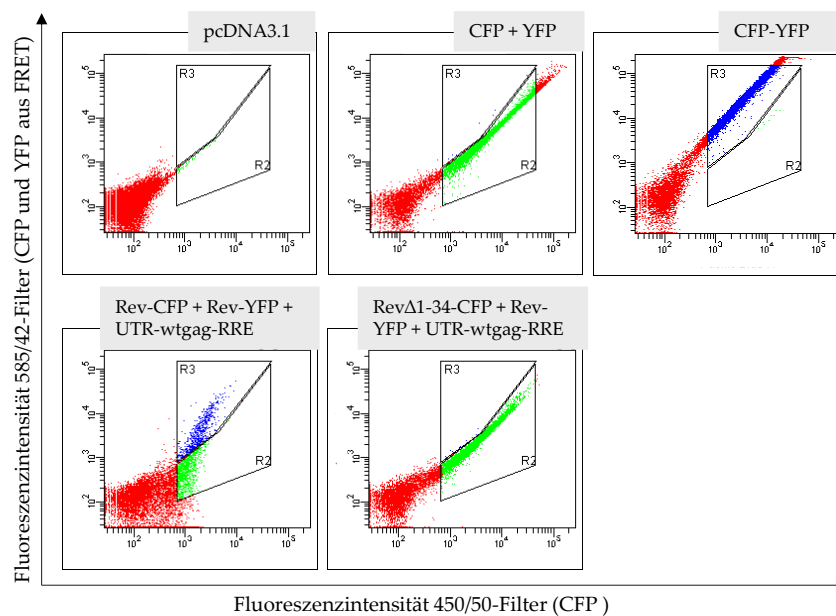


Abb. 3.5: FRET-Analyse.

293T-Zellen wurden mit Konstrukten für die angegebenen Fusionsproteine transfiziert und 48 h später bei Anregung mit dem 405 nm-Laser im FACS analysiert. Die Fluoreszenzintensität im 585/42-Filter (Signal von CFP und YFP aus FRET) wurde gegen die Fluoreszenzintensität im 450/50-Filter (Signal von CFP) aufgetragen. Die definierten Regionen R2 und R3 markieren jeweils FRET-negative (grün) bzw. FRET-positive (blau) Zellen. Obere Reihe: FRET-Kontrollen pcDNA3.1(+) (Negativkontrolle), CFP + YFP (Negativkontrolle) und CFP-YFP-Fusion (Positivkontrolle), untere Reihe: FRET zwischen Rev-CFP + Rev-YFP und RevΔ1-34-CFP + Rev-YFP.

In Abbildung 3.5 sind repräsentative Diagramme der FACS-FRET-Analysen dargestellt. Die quantitative Auswertung der FRET-Analyse zeigt die Abbildung 3.6. Für die Auswertung wurden zwei Regionen R2 und R3 definiert, die so gewählt wurden, dass sich die Zellen der Negativkontrolle CFP + YFP gerade noch in R2 befanden (Abb. 3.5, obere Reihe, Mitte). FRET-positive Zellen wurden in der Region R3 gemessen. Die Positivkontrolle CFP-YFP ist ein Fusionsprotein (optimaler Energietransfer) und ergab das stärkste FRET-positive Signal (Abb. 3.5, obere Reihe, rechts und Abb. 3.6, Balken 5). Die Negativkontrolle YFP erzielte 1 % FRET-positiver Zellen in R3; dieser Wert wurde als Hintergrundsignal betrachtet (Abb. 3.6,

Balken 3). Alle Werte, die unter 1 % lagen, wurden als negatives FRET-Signal interpretiert (Abb. 3.6, Balken: 1-4: pcDNA3.1, CFP, YFP, CFP + YFP). Zusätzlich wurden Kontrollansätze mit Rev-CFP bzw. den Rev-CFP-Deletionsmutanten, YFP und UTR-wtgag-RRE verwendet, die ein eventuell falsch-positives FRET-Signal, bedingt durch YFP oder UTR-wtgag-RRE, ausschliessen sollten (Abb. 3.6, Balken 13-18). Ein FRET-positives Signal konnte neben der Positivkontrolle nur für den Ansatz Rev-CFP + Rev-YFP + UTR-wtgag-RRE mit 4.6 % erhalten werden (Abb. 3.5, untere Reihe, links und Abb. 3.6, Balken 6). Alle Rev-Mutanten zeigten ein FRET-negatives Signal (Abb. 3.5, untere Reihe, rechts und Abb. 3.6, Balken 7-11), was vermutlich auf die Deletion essentieller Bereiche in ihren Oligomerisierungsdomänen zurückzuführen ist. Eine gestörte Oligomerisierungsdomäne resultierte somit in der Hemmung der Oligomerbildung von Rev. Interessanterweise zeigte Rev Δ 64-116-CFP ebenfalls eine gestörte Oligomerisierung (Abb. 3.6, Balken 11), obwohl sich die Deletion auf den C-terminalen Bereich des Proteins beschränkt (3.1.1). Es wäre möglich, dass der C-terminale Teil von Rev eine wichtige Funktion bezüglich der Stabilität und Oligomerbildung des Proteins erfüllt.

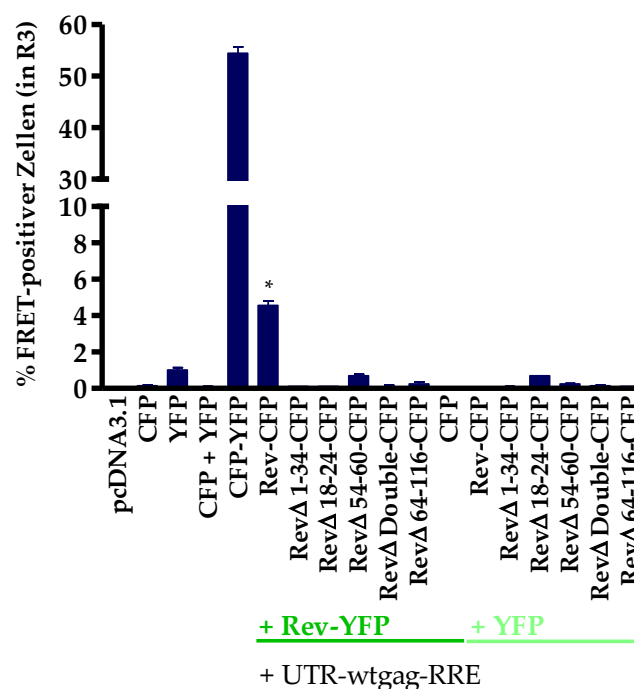


Abb. 3.6 Nachweis der Oligomerisierung von Rev bzw. den Rev-Deletionsmutanten mittels FRET-Analyse.

293T-Zellen wurden mit Konstrukten für die angegebenen Fusionsproteine und/oder pcUTR-wtgag-RRE cotransfiziert und 48 h später bei Anregung mit dem 405 nm-Laser im FACS analysiert. Negativkontrollen: pcDNA3.1(+), CFP, YFP, CFP + YFP; Positivkontrolle: CFP-YFP. Gezeigt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Das FRET-Signal des Wildtyp Rev (Rev-CFP + Rev-YFP + UTR-wtgag-RRE) ist mit $*p < 0.00002$ statistisch signifikant (t-Test) gegenüber dem Hintergrundlevel (CFP + YFP, CFP + Rev-YFP + UTR-wtgag-RRE, Rev-CFP + YFP + UTR-wtgag-RRE).

3.1.4.2 Exportfähigkeit

Die Exportfähigkeit der Rev-Deletionsmutanten lässt sich in einem quasi-lentiviralen Reportersystem sehr gut untersuchen. Eine wesentliche Rolle in diesem System spielt das Konstrukt pcUTR-hivGFP-RRE. Ursprünglich wurde mit diesem Konstrukt der Einfluss des Codongebrauchs auf die Expressionseffizienz in Säugerzellen untersucht. Zunächst wurde die Sequenz von GFP an den Codongebrauch lentiviraler Gene angepasst, was in einer gehemmten Proteinexpression und verringerten RNA-Stabilität resultierte ²¹⁷. Durch das Anfügen der untranslatierten Region (UTR) am 5'-Ende des Gens und der RRE-Sequenz am 3'-Ende konnte die RNA-Stabilität deutlich verbessert werden und eine effiziente, Rev-abhängige Expression von GFP erreicht werden. Somit lässt sich mit Hilfe des Reportergens GFP der Einfluss der Rev-Deletionsmutanten auf den Export RRE-haltiger RNA durch Bestimmung der GFP-Fluoreszenzintensität effizient untersuchen. Die Rev-Deletionsmutanten wurden für den Test mit einem C-terminalen Strep-tag versehen (5.6, 6.2.2.2), weil die CFP-markierten Rev-Varianten die FACS-Analyse der GFP-Expression aufgrund überlappender Emissionsspektren verfälschen würden. Hierzu wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden (Abb. 3.7) transfiziert und 48 h später durchflusscytometrisch (6.5.3) analysiert.

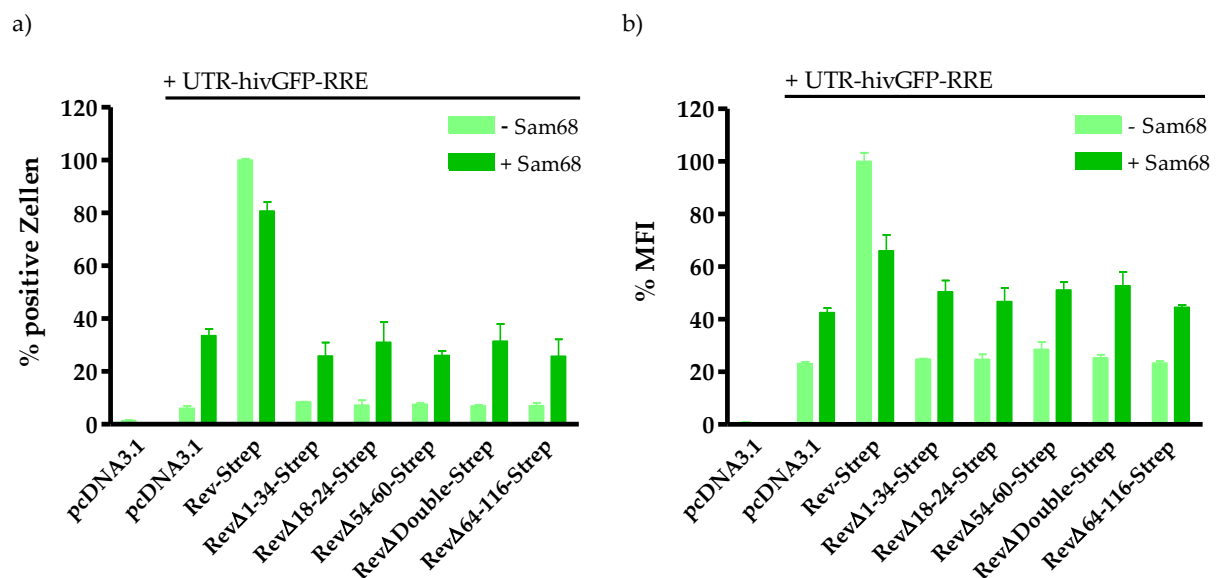


Abb. 3.7: Funktionelle Analyse der Rev-Mutanten mit einem subgenomischen, zellulären Reporterassay.

293T-Zellen wurden mit Konstrukten für HA-Sam68 oder einem Kontrollplasmid pcDNA3.1(+), UTR-hivGFP-RRE und Rev-Strep bzw. den Rev-Strep-Deletionsmutanten im Verhältnis 2:1:1 co-transfiziert und 48 h später im FACS auf die Expression von GFP analysiert. Die Daten sind als Prozentsatz positiver Zellen oder der MFI (*mean fluorescence intensity*) von Rev-Strep, welches 100 % gesetzt wurde, dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Die Expression von GFP war ohne Rev-Strep (Abb. 3.7a und b, Balken 2, in hellgrün) bzw. in Gegenwart der Rev-Strep-Deletionsmutanten deutlich gehemmt (Abb. 3.7a und b, Balken 4-8, in hellgrün). Die geringe basale Expression ist eventuell auf die Expression des endogenen Sam68 zurückzuführen. Wurde der Wildtyp Rev-Strep co-exprimiert, so war eine effiziente Expression von GFP nachweisbar (Abb. 3.7a und b, Balken 3, in hellgrün). Die Überexpression von HA-Sam68 resultierte in Abwesenheit von Rev-Strep (Abb. 3.7a und b, Balken 2, in dunkelgrün) bzw. in Anwesenheit der Rev-Strep Deletionsmutanten (Abb. 3.7a und b, Balken 4-8, in dunkelgrün) in einer leichten Expressionsteigerung von GFP. Wurden HA-Sam68 und Rev-Strep co-exprimiert, so führte dies zu einem Rückgang der Expression um ~20 % bei der Anzahl GFP-positiver Zellen (Abb. 3.7a, Balken 3, in dunkelgrün) bzw. um ~30 % bei der MFI (Abb. 3.7b, Balken 3, in dunkelgrün). Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Exportfähigkeit der Rev-Deletionsmutanten und die damit verbundene Expression des GFP-Reporterproteins vermutlich aufgrund der gestörten Oligomerisierungsfähigkeit eingeschränkt ist. Die Mutanten sind offenbar wahrscheinlich nicht funktionell. Eine Überexpression von Sam68 konnte teilweise die Defekte der Mutanten rekonstituieren. In Abwesenheit von Rev schien Sam68 den Rev-abhängigen Export zu einem geringen Grad zu unterstützen. Überexpression von Sam68 in Anwesenheit von funktionellen Wildtyp Rev hatte allerdings einen negativen Effekt auf den Rev-abhängigen Export.

3.1.4.3 Einfluss auf die HIV-Replikation

Der Einfluss der Rev-Deletionsmutanten auf den viralen Replikationszyklus lässt sich mit Hilfe eines HIV-Replikations-Assays untersuchen (6.5.5). Dazu wurden die Deletionsmutanten zusammen mit dem proviralen Plasmid pNL4-3 in 293T-Zellen co-transfiziert und nach 48 h die Produktion viraler Partikel im Zellüberstand in einem p24-ELISA (6.3.8) analysiert. Dabei ist zu beachten, dass in diesem Kontext nur Einflüsse auf die HIV-1-Replikation in ihrer Gesamtheit, im Allgemeinen nicht aber auf die einzelnen Schritte der Replikation untersucht werden können. Deletionsmutanten mit einem transdominant negativen Phänotyp würden als kompetitiver Inhibitor die HIV-1-Replikation hemmen, was zu einem deutlichen Rückgang der Partikelproduktion führen würde. Die Expression von Rev-CFP bzw. den Rev-CFP-Deletionsmutanten wurde in einer Western Blot-Analyse bestätigt (Abb. 3.8, oberer Western Blot).

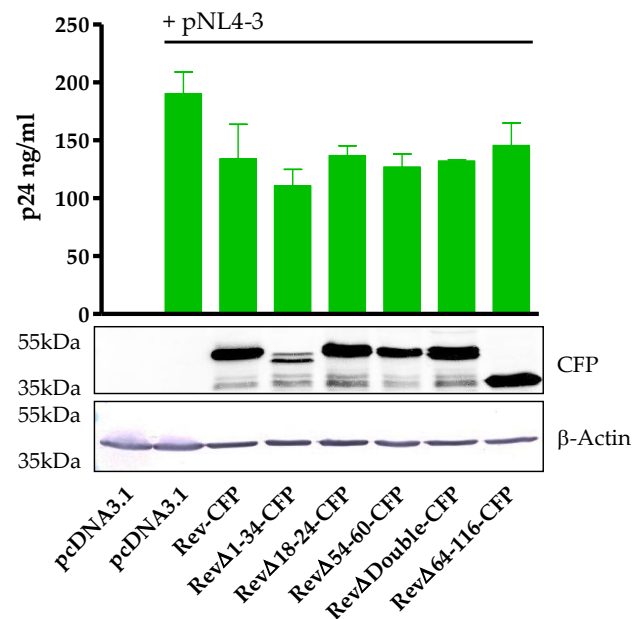


Abb. 3.8: Funktionelle Analyse der Rev-Mutanten mit einem HIV-Replikations-Assay.

293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+) und/oder pNL4-3 und den Rev-CFP DNA-Konstrukten für den Wildtyp bzw. die verschiedenen Rev-Deletionsmutanten im Verhältnis 1:1 co-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die p24-Expression (Virusgehalt) in den Kulturüberständen in einem p24-ELISA vermessen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Expression der Rev-CFP Konstrukte wurde in den Zelllysaten mittels Western Blot-Analyse mit einem α -CFP-spezifischen Antikörper (5.8) detektiert. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Wie in Abbildung 3.8 (Balken 4-8) ersichtlich, führte die Expression der Deletionsmutanten nur zu einer geringen Abnahme der Partikelproduktion im Vergleich zum Provirus (Balken 2). Die Überexpression von Rev-CFP (Abb. 3.8, Balken 3) schien die Partikelproduktion nicht zu begünstigen. Vermutlich entstand hier eine zeitliche Störung der HIV-1-Replikation aufgrund der Tatsache, dass Rev-CFP früher und länger exprimiert wird im Vergleich zum NL4-3 Rev-Protein. Zusammenfassend schienen die Deletion der Sam68-Bindestelle, sowie weitere Deletionen in den funktionell essentiellen Bereichen des Rev-Proteins keinen transdominant negativen Einfluss auf die HIV-1-Replikation zu haben.

3.1.5 Subzelluläre Lokalisation der Rev-Deletionsmutanten

Die Deletion wichtiger Regionen in den Rev-Deletionsmutanten könnte auch auf die Lokalisation der Proteine in der Zelle Auswirkungen haben. Um dies zu untersuchen, wurden die CFP-fusionierten Rev-Mutanten, sowie CFP-Rev und zur Kontrolle CFP in 293T-Zellen exprimiert und 48 h nach Transfektion fluoreszenzmikroskopisch untersucht (6.5.4). Die Emission von CFP konnte nach Anregung im FITC-Filter (grün) fotografiert werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau) und ermöglichten bei Überlagerung beider

Aufnahmen die Unterscheidung der Lokalisation zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma.

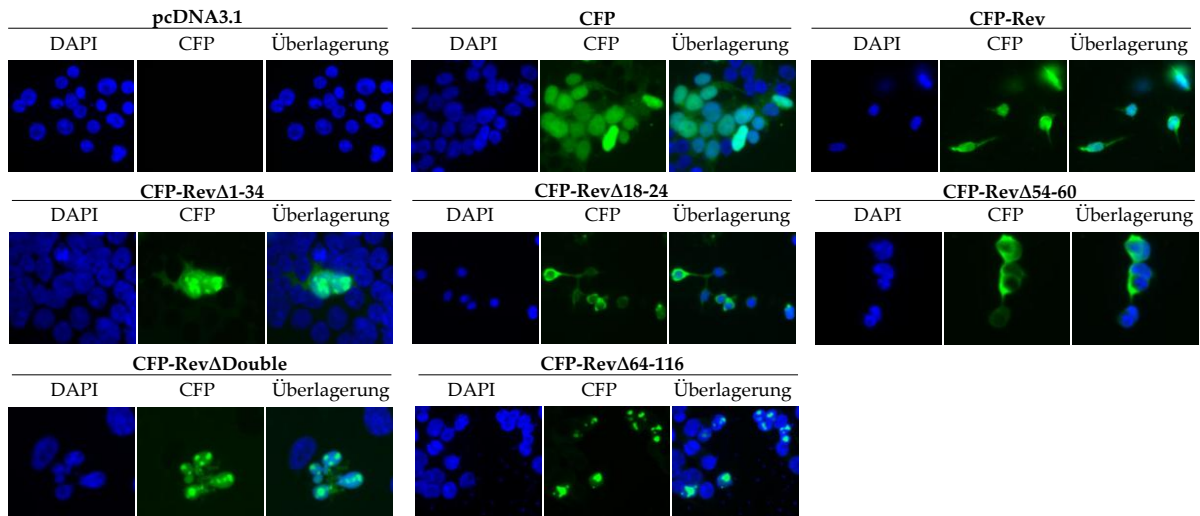


Abb. 3.9: Subzelluläre Lokalisation von CFP-Rev und den CFP-Rev-Deletionsmutanten.

293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die angegebenen CFP-Fusionsproteine sowie mit pcDNA3.1(+) bzw. pECFP-C1 als Kontrollen auf Deckgläschen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert, DAPI-gefärbt und eingedeckt. Repräsentative Zellen wurden bei entsprechender Anregung im DAPI- und im FITC-Filter, der ebenfalls die Messung der CFP-Emission erlaubte, bei 630-facher Vergrößerung fotografiert. Gezeigt sind jeweils die Fluoreszenzen von DAPI und CFP sowie die Überlagerung beider Bilder.

In Abbildung 3.9 sind die Aufnahmen der einzelnen CFP-Rev-Deletionsmutanten, sowie von CFP-Rev, den Kontrollen CFP bzw. pcDNA3.1(+) und die Überlagerung mit den DAPI-Bildern dargestellt. CFP ohne Fusion war gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt. Dies war aufgrund seines Molekulargewichts von 28 kDa, das eine freie Diffusion des Proteins durch die Kernporen ermöglicht, zu erwarten. Mit dem Leervektor pcDNA3.1(+) transfizierte Zellen zeigten keinerlei CFP-Fluoreszenz im FITC-Filter. CFP-Rev wurde sowohl im Nucleus, als auch im Cytoplasma lokalisiert. CFP-Rev Δ 1-34 war ebenfalls auf das Cytoplasma und den Zellkern verteilt, wobei es aber auf bestimmte Kern-Subkompartimente begrenzt zu sein schien. Die Deletionsmutanten CFP-Rev Δ 18-24 und CFP-Rev Δ 54-60 hatten teils ein verändertes Lokalisationsmuster, welches in einer perinucleären Anhäufung der Proteine resultierte. Auch die Mutante CFP-Rev Δ Double, deren deletierter Bereich für die Sam68-Bindung mitverantwortlich ist, konzentrierte sich im Gegensatz zum Wildtyp CFP-Rev eher auf bestimmte Kern-Subkompartimente. Die Deletion der Kernexportsequenz in CFP-Rev Δ 64-116 hatte, wie erwartet, im Vergleich zu den anderen Mutanten eine deutliche Retention im Nucleus zur Folge. Vor allem Mutanten, deren Deletionsbereiche in die Sam68-

Interaktion involviert sind, schienen eine veränderte subzelluläre Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp CFP-Rev zu haben.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung der Rev-Bindestelle im Sam68-Protein

3.2.1 Generierung von Sam68-Deletionsmutanten

Li *et al.* hatten die Rev-Bindestelle in Sam68 in Co-Immunopräzipitationsstudien auf den C-terminalen Bereich des Proteins eingegrenzt. Insbesondere die Aminosäuren 321-410 sollten für die Rev-Bindung verantwortlich sein ¹⁸⁶. Drei Jahre zuvor hatten Reddy *et al.* in *Pull down*-Analysen mit rekombinant hergestellten GST-Sam68-Mutanten gezeigt, dass der Bereich 1-329 an der Rev-Bindung beteiligt sei ¹⁸¹. Wurde diese Region deletiert, so konnte die trunkierte Sam68-Mutante mit den Aminosäuren 330-443 Rev nicht binden. Im Gegenzug dazu konnte die Deletion der AS 330-443 die Rev-Bindung nicht aufheben. Werden diese Erkenntnisse zusammengeführt, so müsste die Region 321-410 im C-Terminus für die Rev-Bindung verantwortlich sein. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst die Sam68-Deletionsmutanten 1-4 hergestellt (Abb. 3.10):

1. Sam68 Δ 330-443
2. Sam68 Δ 321-330
3. Sam68 Δ 321-410
4. Sam68 Δ 321-443

Es sei erwähnt, dass Sam68 Δ 330-443 und Sam68 Δ 321-443 kein Kernlokalisierungssignal besitzen und dem zu Folge einen transdominant negativen Phänotyp im Kontext der HIV-1-Replikation zeigen (1.4.2). Beide gehören zur Klasse von Sam68 Δ C-Mutanten, die kein Kernlokalisierungssignal besitzen und transdominant negativ auf die HIV-Replikation wirken. Sam68 Δ 321-410 zeichnet sich durch die Deletion der Prolin-reichen Motive P4-P5 und der Tyrosin-reichen Region, welche für die Bindung der SH2-Domänen verantwortlich ist, aus (1.4.1). Sam68 Δ 321-330 besitzt lediglich eine Deletion von neun Aminosäuren zwischen den Motiven P3 und P4.

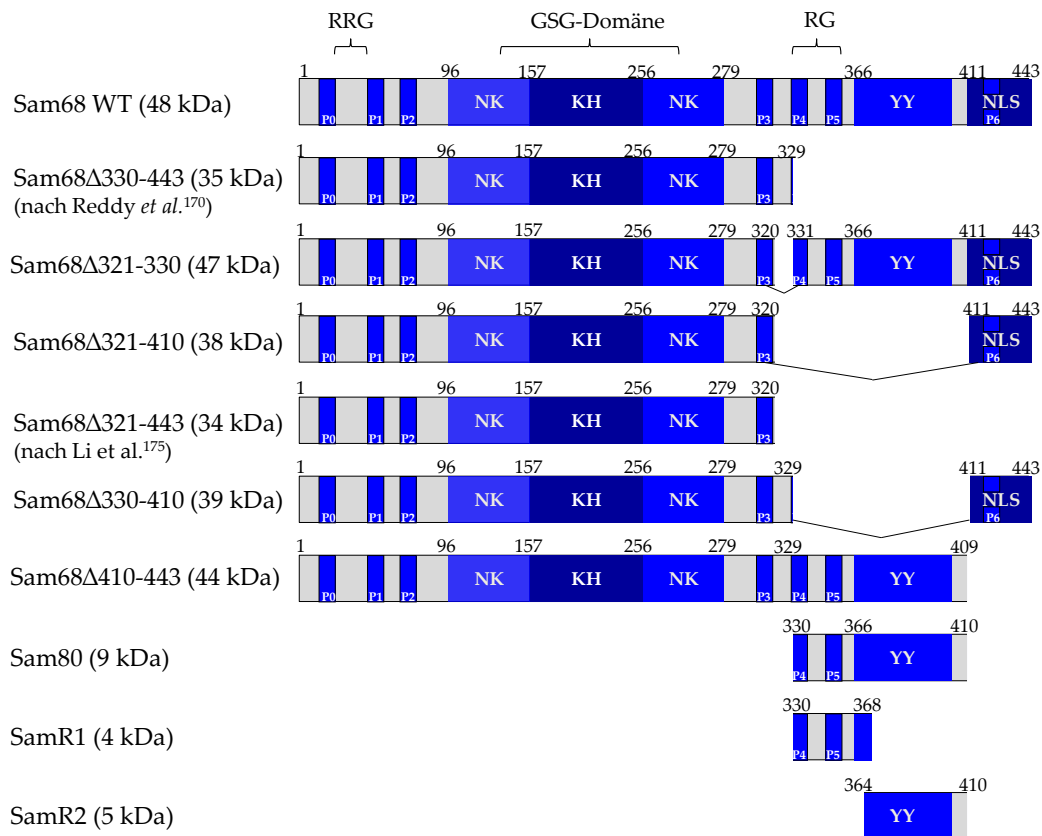


Abb. 3.10: Schematische Darstellung des Ausgangskonstruktes Sam68 WT (Wildtyp) und der Sam68 Deletionsmutanten.

Die funktionellen Domänen des Proteins sind in der Abbildung gekennzeichnet. GSG-Domäne: besteht aus der RNA-bindenden KH-Domäne und den flankierenden N- und C-terminalen Segmenten; P0-P6 (Prolin-reiche Regionen): Bindung der SH3-Domänen; YY (Tyrosin-reiche C-terminale Region): Bindung der SH2-Domänen; RRG: Arginin-Glycin-reiche Region; NLS: Kernlokalisierungssignal.

Aufgrund der Erkenntnisse aus der *in vivo*-Interaktionsstudie, welche im Kapitel 3.2.2 detailliert beschrieben werden, wurden die nächsten Mutanten Sam68 Δ 330-410, Sam68 Δ 410-443, Sam80, SamR1 und SamR2 erstellt und auf eine Rev-Interaktion untersucht. Sam68 Δ 330-410 unterscheidet sich von der Mutante Sam68 Δ 321-410 nur um neun Aminosäuren. Sam80 besteht aus der Region, welche in Sam68 Δ 330-410 deletiert wurde. Die Peptide SamR1 und SamR2 unterteilen die Region AS 330-410 zur feineren Eingrenzung der Rev-Bindestelle (im Detail 3.2.2). Die Mutante Sam68 Δ 410-443 besitzt kein Kernlokalisierungssignal und sollte womöglich im Phänotyp stark den Sam68 Δ C-Mutanten ähneln.

Die Klonierungsstrategie und die verwendeten Oligonucleotide für die entsprechenden Konstrukte sind in den Kapiteln 5.6 und 6.2.2.1 bzw. 6.2.2.2 beschrieben. Wie bei den Rev-Mutanten wurde das für die jeweilige Sam68-Mutante codierende DNA-Fragment ebenfalls mit entsprechenden Schnittstellen konstruiert, so dass eine Umklonierung in verschiedene eukaryotische oder prokaryotische Expressionsplasmide (6.2.2.1, 6.2.2.2) problemlos möglich war.

3.2.2 Co-Immunopräzipitation zur Analyse der Rev/Sam68-Interaktion *in vivo*

Für die *in vivo*-Analyse der Rev/Sam68-Interaktion zur Identifikation der Rev-Bindestelle in Sam68 mittels Co-Immunopräzipitation wurden die Sam68-Konstrukte N-terminal mit einem HA-tag (1 kDa) versehen (6.2.2.2). Das Rev-Konstrukt enthielt am C-terminalen Ende ein Strep-tag (1 kDa) (6.2.2.2).

293T-Zellen wurden zur Expression der Fusionsproteine mit den Plasmiden pcHA-Sam68 und pcRev-Strep oder pcDNA3.1(+), pcRev-Strep und pcHA-Sam68 Δ 330-443, pcHA-Sam68 Δ 321-330, pcHA-Sam68 Δ 321-410, pcHA-Sam68 Δ 321-443, pcHA-Sam68 Δ 330-410, pcHA-Sam68 Δ 410-443, pcHA-Sam68-Rev-Strep, oder pcHA-Sam80 in einem Verhältnis von 1:1 transfiziert (6.5.1). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und je 100 μ g Gesamtprotein von jedem Ansatz elektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschliessend mittels Western Blot auf Expression der Konstrukte mit α -HA- oder α -Strep-spezifischen Antikörpern analysiert (5.8). HA-Sam68 konnte auf einer Höhe von ~68 kDa detektiert werden (Abb. 3.11a, Spuren 1-2). Die Sam68-Deletionsmutanten wurden je nach Molekulargewicht zwischen ~50 und ~68 kDa detektiert (Abb. 3.11a, Spuren 3-8). Die errechneten Größen der Mutanten (3.2.1, 34 – 47 kDa) liegen deutlich unter dem detektierten Bereich. Die Proteine werden trotz der Deletion wichtiger Regionen *in vivo* weiterhin wie der Wildtyp Sam68 posttranslational modifiziert. Neben der Bande des vollständigen Proteins wurden auch oft Abbauprodukte der Sam68-Proteine detektiert (Abb. 3.11a und b). Das Fusionsprotein aus HA-Sam68 und Rev-Strep, welches als zusätzliche Positivkontrolle dienen sollte, verlief ein wenig höher als Sam68 (Abb. 3.11a, Spur 9). HA-Sam80, welches die Region AS 330-410 abbildet, musste aufgrund seines geringen Molekulargewichts (errechnet 9 kDa, tatsächliche Größe im Western Blot ~20 kDa) in einer gesonderten SDS-PAGE analysiert werden (Abb. 3.11a, Spur 10). Die Expression von Rev-Strep zeigte eine charakteristische Doppelbande bei ~15-18 kDa (Abb. 3.11a, Spuren 2-8 und 10). Vermutlich bildet das höhermolekulare Protein der Doppelbande, welche nur in hochprozentiger SDS-PAGE ersichtlich war, eine posttranslational modifizierte Form des Fusionsproteins Rev-Strep ab ^{57,218}. HA-Sam68-Rev-Strep wurde nicht nur bei ~75 kDa detektiert, sondern auch als zahlreiche niedermolekulare Banden (Abb. 3.11a, Spur 9). Hierbei könnte es sich um nach der Translation des großen Fusionsproteins entstandene Degradationsprodukte handeln, die aufgrund ihres Strep-tags detektiert werden konnten.

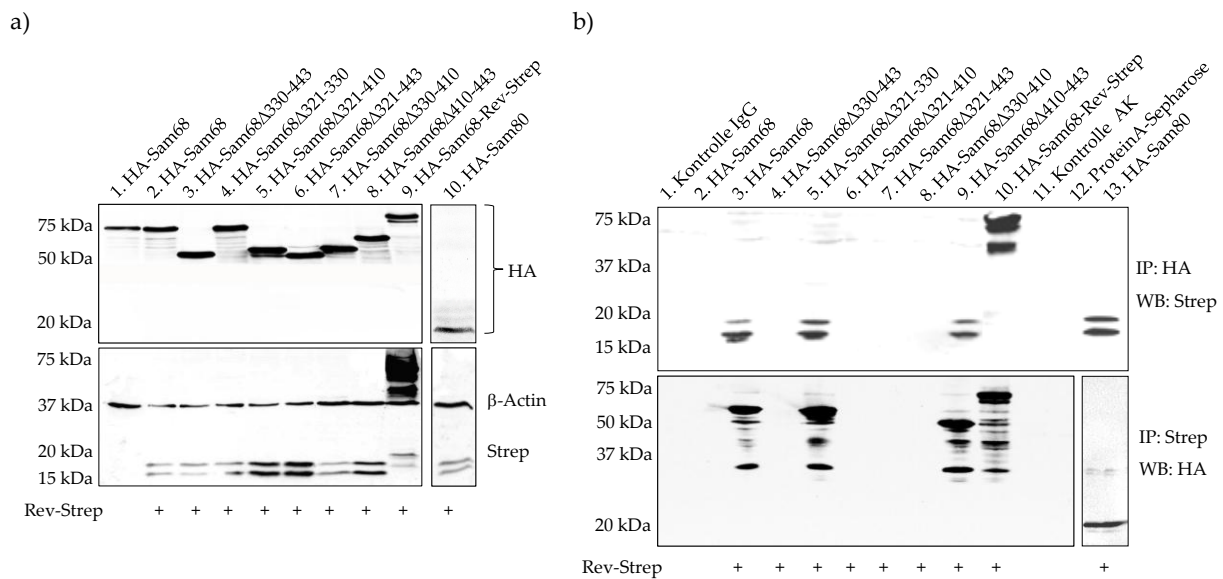


Abb. 3.11: Analyse der Rev/Sam68-Interaktion *in vivo*.

a) Expressionsnachweis des exprimierten Rev-Strep, des HA-Sam68 bzw. der HA-Sam68-Deletionsmutanten mittels Western Blot-Analyse.

293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für HA-Sam68 und pcDNA3.1(+) (Spur 1) bzw. Rev-Strep (Spur 2) und für die HA-Sam68-Deletionsmutanten und Rev-Strep (Spuren 3-10) transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Expression wurde mit einem α -Strep-Antikörper für Rev-Strep und einem α -HA-Antikörper für HA-Sam68 oder HA-Sam68-Deletionsmutanten analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Actin.

b) Nachweis der *in vivo*-Interaktion zwischen Rev-Strep und HA-Sam68 bzw. HA-Sam68-Deletionsmutanten mittels Co-Immunopräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse.

ProteinA-Sepharose-Beads wurden mit 2 μ g eines α -HA-spezifischen oder α -Strep-spezifischen Antikörpers inkubiert und anschliessend mit Zellysaten (500 μ g) aus transfizierten 293T-Zellen versetzt. Gebundenes Rev-Strep bzw. HA-Sam68 oder gebundene HA-Sam68-Deletionsmutanten wurden nach Co-Immunopräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

Die Analyse der Rev-Bindestelle in Sam68 erfolgte in einer Co-Immunopräzipitation (Co-IP) (6.3.7). Hierzu wurden hergestellte Zellysate jeweils mit einem α -HA- oder α -Strep-spezifischen Antikörper, der vorher an ProteinA-Sepharose-Beads gebunden wurde, inkubiert. Eine Interaktion konnte in einer nachfolgenden Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Die Mutanten HA-Sam68Δ330-443, HA-Sam68Δ321-410 und HA-Sam68Δ321-443 (Abb. 3.11b, Spuren 4, 6-7) konnten Rev-Strep aufgrund ihrer deletierten Regionen nicht binden. Die Deletion der neun Aminosäuren (HA-Sam68Δ321-330), welche den Daten aus der Literatur zufolge eventuell in die Rev-Bindung involviert ist, führte zu keinem Interaktionsverlust (Abb. 3.11b, Spur 5). Ebenfalls zeigte HA-Sam68Δ410-443 noch eine intakte Rev-Interaktion (Abb. 3.11b, Spur 9). Führt man diese Erkenntnisse zusammen, so ist der Rev-Bindebereich in Sam68 auf die Region AS 330-410 einzugrenzen. Dies bestätigte sich auch durch die Mutanten HA-Sam68Δ330-410 bzw. HA-Sam80 (Abb. 3.11b, Spuren 8 und 13). Die Kontrollen IgG (Abb. 3.11b, Spur 1), AK (Abb. 3.11b, Spur 11) und unbeladene ProteinA-Sepharose-Beads (Abb. 3.11b, Spur 12) zeigten keine Signale im Western Blot

(Erklärung in 3.1.2). Die beiden Positivkontrollen HA-Sam68 bzw. HA-Sam68-Rev-Strep und Rev-Strep (Abb. 3.11b, Spuren 3 und 10) wiesen auf eine bestehende Interaktion hin. HA-Sam68 ohne Rev-Strep (Abb. 3.11b, Spur 2) wurde als Negativkontrolle in der Co-Immunopräzipitation verwendet.

Die Rev-Bindestelle, ein linearer Bereich von 80 Aminosäuren im C-Terminus von Sam68, sollte noch weiter eingegrenzt werden. Dadurch kann besser beurteilt werden, welche Aminosäuren in Sam68 an der Rev-Interaktion beteiligt sind und diese können gezielt einer randomisierten Mutagenese zur Selektion von Bindern mit einem höher affinen Interaktionsbereich unterzogen werden. Aus diesem Grund wurde die Region auf die Peptide R1 (AS 330-368, Prolin-reich) und R2 (AS 364-410, Tyrosin-reich) aufgeteilt und in einer weiteren Co-Immunopräzipitation (6.3.7) auf die Rev-Bindung untersucht. Hierfür wurden die Konstrukte SamR1 und SamR2 N-terminal mit dem größeren CFP (28 kDa) fusioniert (6.2.2.2), das die Detektion im Western Blot erleichtern sollte. CFP-Sam68 (6.2.2.2) wurde als Positivkontrolle verwendet. Alle drei Konstrukte wurden mit Rev-Strep in 293T-Zellen co-transfiziert und die Expression in den hergestellten Zelllysaten nach 48 h im Western Blot überprüft (Abb. 3.12a, Spuren 2-4). Zusätzliche Banden weisen auf Abbauprodukte bei CFP-Sam68 und CFP-SamR1 hin. CFP-Sam68 wurde als Negativkontrolle ohne Rev-Strep transfiziert (Abb. 3.12a, Spur 1).

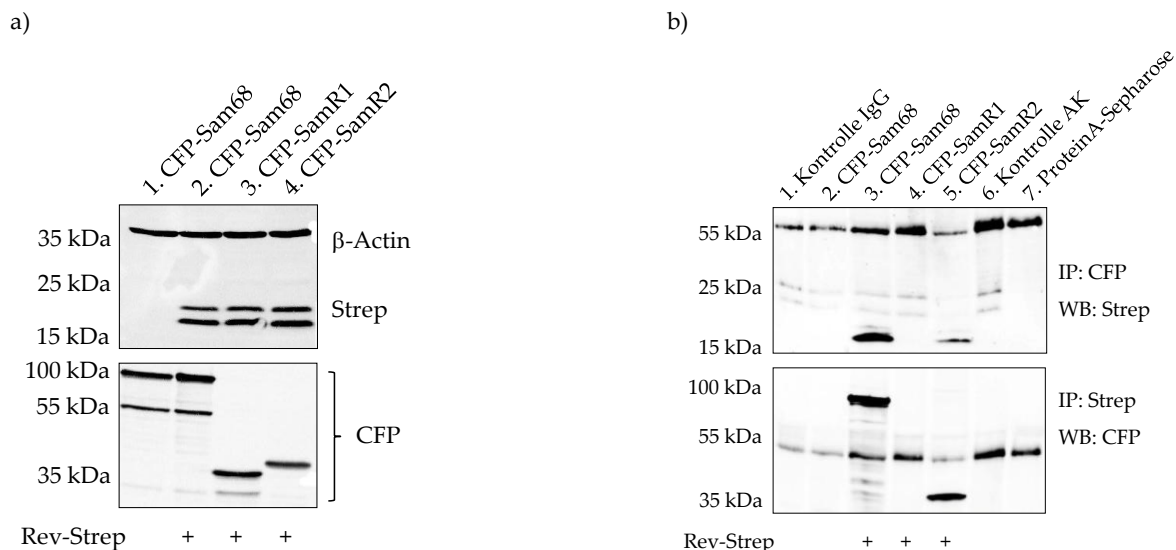


Abb. 3.12: Weitere Eingrenzung der Rev-Bindestelle *in vivo*.

a) Expressionsnachweis des exprimierten Rev-Strep, des CFP-Sam68 bzw. der Peptide CFP-SamR1 und CFP-SamR2 mittels Western Blot-Analyse.

293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für CFP-Sam68 und pcDNA3.1(+) (Spur 1) bzw. Rev-Strep (Spur 2) und für die Peptide CFP-SamR1 bzw. CFP-SamR2 und Rev-Strep (Spuren 3-4) transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Expression wurde mit einem α -Strep-Antikörper für Rev-Strep und einem α -CFP-Antikörper für CFP-Sam68 oder CFP-SamR1 bzw. CFP-SamR2 analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Actin.

b) Nachweis der *in vivo*-Interaktion zwischen Rev-Strep und CFP-Sam68 bzw. CFP-SamR1 und CFP-SamR2

mittels Co-Immunopräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse.

ProteinA-Sepharose-*Beads* wurden mit 2 µg eines α-CFP-spezifischen oder α-Strep-spezifischen Antikörpers inkubiert und anschliessend mit Zelllysaten (500 µg) von transfizierten 293T-Zellen versetzt. Gebundenes Rev-Strep bzw. CFP-Sam68 oder gebundene Peptide CFP-SamR1 oder CFP-SamR2 wurden nach Co-Immunopräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

Die weitere Analyse der 80 Aminosäuren ergab, dass die Region AS 364-410 (CFP-SamR2) für die Rev-Interaktion hinreichend ist (Abb. 3.12b, Spur 5). CFP-SamR1 hingegen ist nicht in die Rev-Bindung involviert (Abb. 3.12b, Spur 4). Das Wildtypprotein CFP-Sam68 interagiert mit Rev-Strep (Abb. 3.12b, Spur 3). Die Doppelbande bei ~25 kDa zeigte teilweise eine Erkennung der leichten Antikörperketten (Abb. 3.12b). Desweiteren wurde die schwere Antikörperkette, zusammen mit der unbeladenen ProteinA-Sepharose bei ~55 kDa detektiert (Abb. 3.12b). Beide korrelieren aber nicht mit der Detektion von Rev-Strep bzw. CFP-Sam68 und CFP-SamR2. Eine unspezifische Bindung oder Kreuzreaktion der Antikörper wurde mit den Kontrollen IgG und AK ausgeschlossen (Abb. 3.12b, Spuren 1 und 6).

3.2.3 FRET-Analyse zur Untersuchung der Rev/Sam68-Interaktion *in vivo*

Wie bereits im Kapitel 3.1.4.1 beschrieben, eignet sich die FRET-FACS-Analyse (6.5.3) zur Untersuchung von Proteininteraktionen *in vivo*. Daher sollte die Interaktion zwischen Rev und dem linearen Motiv Sam80 bzw. SamR2, als auch dem Wildtypprotein Sam68 im FRET-System nochmals bestätigt werden. Dazu wurden die Sam68 Konstrukte N-terminal an YFP fusioniert (6.2.2.2) und mit den Expressionsplasmiden für Rev-CFP bzw. CFP und UTR-wtgag-RRE, zur Kontrolle, um ein falsch-positives FRET-Signal bedingt durch CFP oder UTR-wtgag-RRE auszuschliessen, in 293T-Zellen co-transfiziert und 48 h später im FACS analysiert. Für eine detaillierte Beschreibung der FRET-FACS-Auswertung und Darstellung repräsentativ ausgewählter Diagramme sei auf das Kapitel 3.1.4.1 verwiesen.

Die Positivkontrolle CFP-YFP (optimaler Energietransfer) hatte, wie erwartet, das stärkste FRET-positive Signal (Abb.3.13, Balken 5). Die Kontrolle Rev-CFP + YFP + UTR-wtgag-RRE (Abb. 3.13, Balken 10) ergab 0.7 % positive Zellen in der Region R3 (positiver FRET-Effekt). Daher wurden alle Werte, die unter 0.7 % lagen, als negatives FRET-Signal interpretiert (Abb. 3.6, Balken 1-4: pcDNA3.1, CFP, YFP, CFP + YFP). Ein statistisch signifikantes FRET-positives Signal lieferten die Positivkontrolle Rev-YFP + Rev-CFP + UTR-wtgag-RRE (Abb. 3.13, Balken 6) und das Peptid YFP-SamR2 + Rev-CFP + UTR-wtgag-RRE (Abb. 3.13, Balken 7). Die FRET-Analyse der Rev-Interaktionsbereiche in YFP-Sam80 und YFP-Sam68 zeigte einen mit < 0.2 % FRET-positiver Zellen verminderten FRET-Effekt (Abb. 3.13, Balken 8 und

9). Möglicherweise führte die Erweiterung der Interaktionsregion während des FRET-Effekts zu sterischen Hinderungen bei der Energieübertragung von CFP auf YFP. Insgesamt stützen die FRET-Daten die Ergebnisse der Co-Immunoprecipitation, in welcher der Rev-Bindebereich in Sam68 auf die Region AS 364-410 eingegrenzt werden konnte.

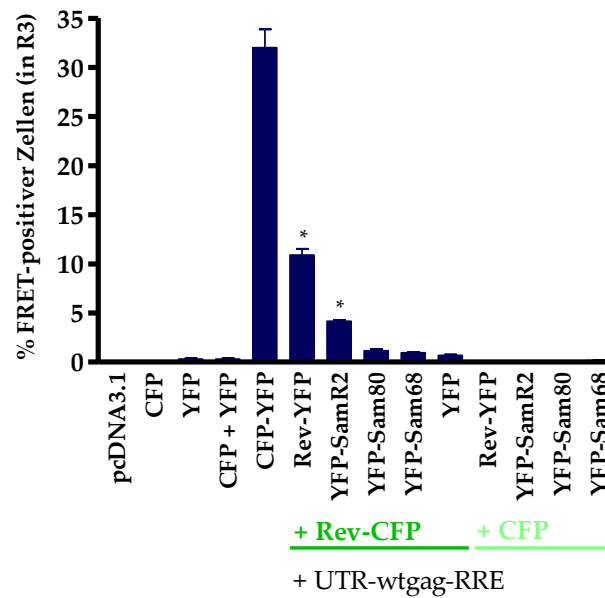


Abb. 3.13 Nachweis der Rev/Sam68-Interaktion mittels FRET-Analyse.

293T-Zellen wurden mit Konstrukten für die angegebenen Fusionsproteine und pcUTR-wtgag-RRE co-transfiziert und 48 h später bei Anregung mit dem 405 nm-Laser im FACS analysiert. Negativkontrollen: pcDNA3.1(+), CFP, YFP, CFP + YFP; Positivkontrolle: CFP-YFP. Gezeigt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Das FRET-Signal von Wildtyp Rev (Rev-CFP + Rev-YFP + UTR-wtgag-RRE) und von YFP-SamR2 (YFP-SamR2 + Rev-CFP + UTR-wtgag-RRE) ist mit $*p < 0.0001$ statistisch signifikant (t-Test) gegenüber dem Hintergrundlevel (CFP + YFP, YFP + Rev-CFP + UTR-wtgag-RRE, Rev-YFP + CFP + UTR-wtgag-RRE, YFP-SamR2 + CFP + UTR-wtgag-RRE).

3.2.4 Pull down-Assay zur Analyse der Rev/Sam68-Interaktion *in vitro*

Das Volllängeprotein Sam68 zeigte eine schlechte Expression in Bakterien und wurde teilweise degradiert. Auch die Verwendung eines Sam68-Konstrukts mit für *E. coli* optimierter *Codon-usage* verbesserte die Ausbeute und Reinheit des Proteins nicht (persönliche Mitteilung von Dr. Benedikt Asbach). Daher wurden *in vitro*-Interaktionsanalysen lediglich mit den stark verkürzten Proteinen Sam80, SamR1 und SamR2 durchgeführt. Diese wurden in das pGEX-KG Expressionsplasmid kloniert (6.2.2.1), in *E. coli* exprimiert (6.3.1) und über die Affinitätsmatrix Glutathion-Sepharose aufgereinigt (6.3.2.1). Abbildung 3.14 zeigt für GST-SamR2 exemplarisch alle Expressions- und Aufreinigungsschritte, welche in einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert wurden. Für den Pull down-Assay wurde die dritte Elutionsfraktion (Abb. 3.14,

Spur 8), die das reinste Protein im Vergleich zu den Fraktionen 1 und 2 (Abb. 3.14, Spuren 6 und 7) enthielt, verwendet. Neben SamR2 waren auch trunkierte, eventuell degradierte Proteine als Verunreinigung enthalten.

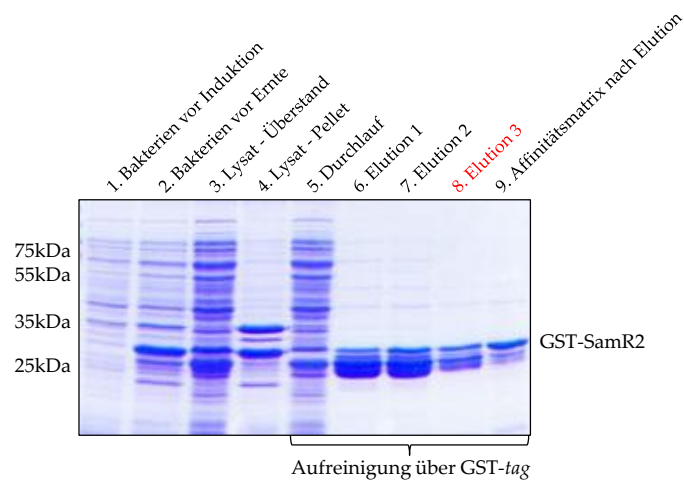


Abb. 3.14: Aufreinigungsschritte des exprimierten Fusionsproteins GST-SamR2 (33 kDa).

Während der Expressions- und Aufreinigungsprozedur wurden stets Aliquots zur Kontrolle der einzelnen Schritte entnommen, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Für die Expressions- und Interaktionsanalyse wurde die Elutionsfraktion 3 (rot markiert) herangezogen.

Die Expression aller aufgereinigten Fusionsproteine wurde im Western Blot mit einem α -GST-spezifischen Antikörper (5.8) verifiziert. Dabei wurden neben den Volllänge-Proteinen teilweise auch die Abbauprodukte erkannt (Abb. 3.15a).

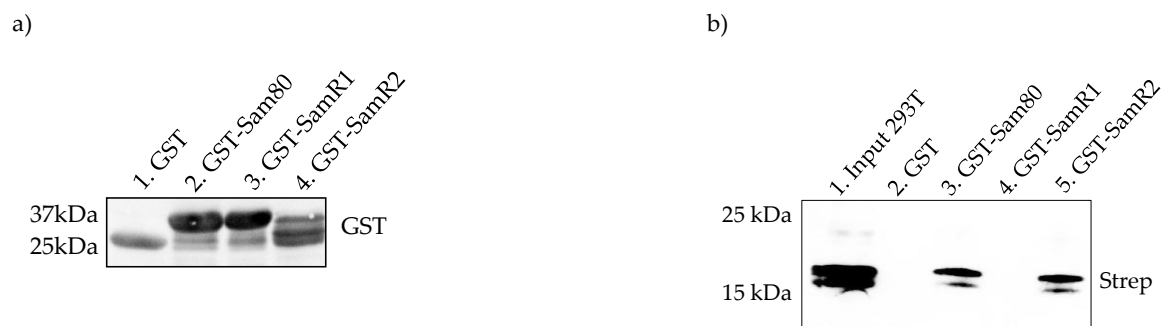


Abb. 3.15: Analyse der Rev/Sam68-Interaktion *in vitro*.

a) Expressionsnachweis der aufgereinigten Proteine.

60 μ g Gesamtprotein wurden pro Spur geladen und mit einem α -GST-Antikörper mittels einer Western Blot-Analyse detektiert.

b) Nachweis der *in vitro*-Interaktion zwischen Rev-Strep und den GST-fusionierten Peptiden von Sam68 mittels Pull down-Assay und anschließender Western Blot-Analyse.

Die aufgereinigten Proteine (60 μ g) wurden an magnetische *Beads* gebunden und mit 2.5 mg Zelllysat aus transfizierten 293T-Zellen inkubiert. Zelllysat aus transfizierten 293T-Zellen diente als Kontrolle der Expression von Rev-Strep. Gebundenes Protein wurde in einer Western Blot-Analyse mit einem α -Strep-Antikörper (5.8) detektiert.

Der Rev-Bindebereich sollte *in vitro* im *Pull down*-Assay verifiziert werden (6.3.6). Hierfür wurden die aufgereinigten Proteine GST-Sam80, GST-SamR1 und GST-SamR2 an magnetische *Beads* gekoppelt und durch Inkubation mit Zelllysat von 293T-Zellen, die mit

einem Expressionsplasmid für Rev-Strep transfiziert worden waren (Abb. 3.15b, Spur 1), auf die Interaktion mit Rev untersucht. GST zeigte als Negativkontrolle keine Interaktion mit Rev-Strep (Abb. 3.15b, Spur 2). GST-Sam80 und GST-SamR2 (Abb. 3.15b, Spuren 3 und 5) bestätigten die Bindung an Rev-Strep und somit die *in vivo*-Daten, wohingegen GST-SamR1 keine Interaktion aufwies (Abb. 3.15b, Spur 4).

3.2.5 Funktionelle Charakterisierung der Sam68-Deletionsmutanten

Eine funktionelle Charakterisierung der Sam68-Deletionsmutanten (insbesondere die Deletion der Rev-Bindestelle) könnte Hinweise auf die Bedeutung der Rev/Sam68-Interaktion bei der HIV-1-Replikation liefern. Deswegen sollte zunächst der Einfluss auf den Export RRE-haltiger RNA in einem subgenomischen Reportersystem untersucht werden (3.2.5.1). Da dieses System auf einen Schritt der viralen Replikation reduziert ist, muss der Einfluss im proviralen Kontext durch Co-Expression des Provirus und der Sam68 Konstrukte betrachtet werden (3.2.5.2). Ob die Sam68-Mutanten während der HIV-Replikation überhaupt funktionell sind, kann mit einem Kompletions-Assay analysiert werden (3.2.5.3). Hier wird der transdominant negative Effekt der Sam68 Δ C-Mutante ausgenutzt, um die Virusproduktion zu verringern. Eine gleichzeitige Co-Expression der Sam68-Mutanten zeigt, ob diese fähig sind den Effekt zu komplementieren.

3.2.5.1 Einfluss auf den Export RRE-haltiger RNA

Zur Untersuchung des Rev-abhängigen RNA-Exports wurde in der Arbeitsgruppe ein subgenomisches Reportersystem auf der Basis des HIV-1 *gag*-Gens entwickelt. Die Sequenz von *gag* wurde zusammen mit der 5' untranslatierten Region UTR, die den effizient genutzten Spleißdonor D1 des HIV-1 Genoms enthält, in einen eukaryotischen Expressionsvektor eingebracht. An das 3'-Ende von *gag* wurden das RRE und ein schwacher Spleißakzeptor A7 - beide stammen aus der Region des *env*-Leserahmens - angefügt. In Säugerzellen wird das Gag-Protein in Abhängigkeit von Rev exprimiert²¹⁵. Dieses System eignet sich daher auch, um den Einfluss von zellulären Proteinen wie Sam68 auf den Export RRE-haltiger RNA zu analysieren. Haben die Sam68-Mutanten einen negativen oder inhibierenden Effekt auf den Export, so würde das in einer Abnahme der Gag-Expression resultieren.

293T-Zellen wurden mit Konstrukten für UTR-wtgag-RRE, Rev-Strep und den in 3.2.1 vorgestellten an ein HA-tag fusionierten Sam68-Mutanten, sowie dem Wildtyp HA-Sam68 transfiziert. Nach 48 h wurde die Gag-Expression in den Zellüberständen mit einem p24-ELISA (6.3.8) quantifiziert.

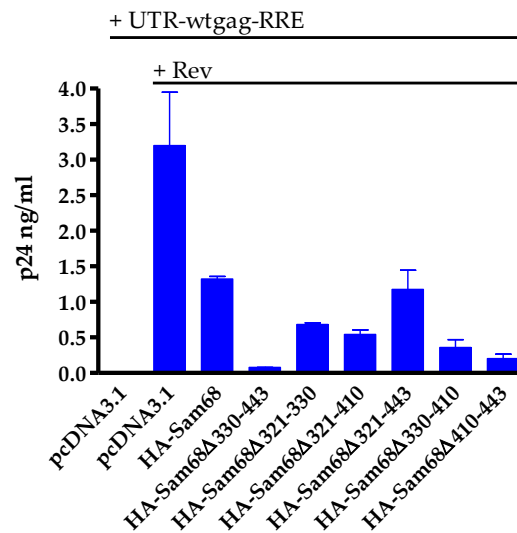


Abb. 3.16: Funktionelle Analyse der Sam68-Mutanten mit einem subgenomischen, zellulären Reporterassay. 293T-Zellen wurden mit Konstrukten für Rev-Strep oder einem Kontrollplasmid pcDNA3.1(+), UTR-wtgag-RRE und HA-Sam68 bzw. für die HA-Sam68-Deletionsmutanten im Verhältnis 1:10:16 co-transfiziert und 48 h später im p24-ELISA auf die Expression von Gag in den Kulturüberständen analysiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten.

Wie erwartet, erreichte die Gag-Expression in Anwesenheit von Rev-Strep ihren höchsten Wert (Abb. 3.16, Balken 2). Wurde zusätzlich HA-Sam68 überexprimiert, so führte dies zu einer um das 2.4-fache geringeren Gag-Expression (Abb. 3.16, Balken 3, Vergleich mit Balken 2). Diese Tendenz wurde auch während der Analyse der Rev-Deletionsmutanten im quasi-lentiviralen GFP-Reportersystem beobachtet (3.1.4.2). Die Deletion der Kernlokalisationssequenz NLS bei den Mutanten HA-Sam68Δ330-443 und HA-Sam68Δ410-443 schien die Expression von Gag stark zu unterdrücken (Abb. 3.16, Balken 4 und 9). Die Mutanten HA-Sam68Δ321-330, HA-Sam68Δ321-410 und HA-Sam68Δ330-410 (Abb. 3.16, Balken 5, 6 und 8) zeigten im Vergleich zur Überexpression des Wildtyps HA-Sam68 ebenfalls eine gesenkte Gag-Expression, aber nicht in dem Ausmass wie die NLS-deletierten Mutanten. HA-Sam68Δ321-443, ebenfalls ohne NLS, unterscheidet sich von HA-Sam68Δ330-443 nur durch eine Deletion von zusätzlichen 9 Aminosäuren. Im Bezug auf den Export der gag-RNA schien sie aber im Vergleich zu den anderen NLS-deletierten Mutanten keinen negativen Einfluss zu nehmen (Abb. 3.16, Balken 7). Vielmehr revidierte sie den transdominant negativen Phänotyp der NLS-deletierten Sam68-Mutanten. Es lässt dich

daher schlussfolgern, dass die Präsenz dieser 9 Aminosäuren (321-330) wichtig ist für den transdominant negativen Phänotyp.

3.2.5.2 Einfluss auf die HIV-Replikation

Der Einfluss der Sam68-Deletionsmutanten auf die HIV-Replikation wurde in einem HIV-Replikations-Assay (6.5.5) untersucht. Hierfür wurde provirale DNA (pNL4.3, 5.5) mit den Expressionsplasmiden für HA-Sam68 oder für die HA-Sam68-Deletionsmutanten in 293T-Zellen co-transfiziert und nach 48 h der Gehalt an Viruspartikeln (Gag-Expression) im p24-ELISA (6.3.8) analysiert. Die Expression der HA-Sam68 Konstrukte wurde in einer Western Blot-Analyse mit einem α -HA-spezifischen Antikörper (5.8) nachgewiesen.

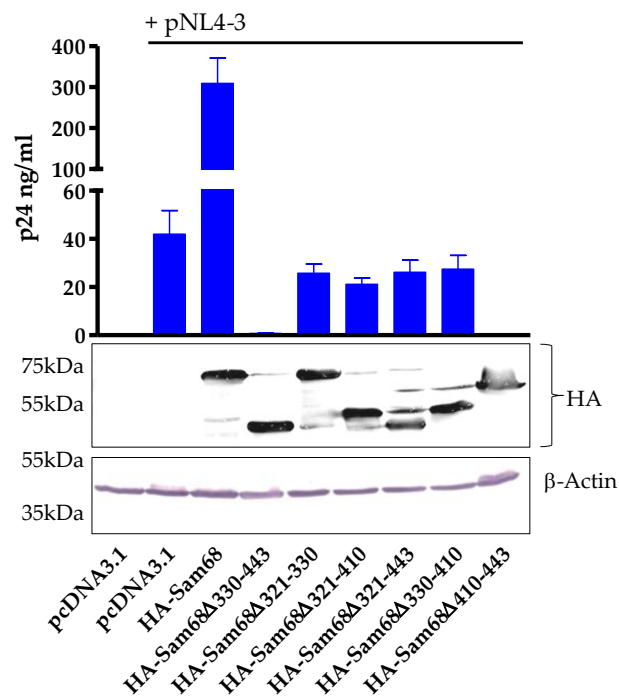


Abb. 3.17: Funktionelle Analyse der Sam68-Mutanten mit einem HIV-Replikations-Assay.

293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+) und/oder pNL4-3 und den HA-Sam68 DNA-Konstrukten für den Wildtyp bzw. die verschiedenen Sam68-Deletionsmutanten im Verhältnis 1:16 co-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Gag-Expression (Virusgehalt) in den Kulturüberständen in einem p24-ELISA vermessen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Expression der HA-Sam68 Konstrukte wurde in den Zelllysaten mittels Western Blot-Analyse mit einem α -HA-spezifischen Antikörper (5.8) detektiert. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Produktion des reinen Provirus resultierte in einer p24-Menge von ~40 ng/ml (Abb. 3.17, Balken 2). Wurde HA-Sam68 überexprimiert, so erhöhte sich die Gag-Expression um das 7,5-fache (Abb. 3.17, Balken 3). Die Expression der NLS-Deletionsmutanten HA-Sam68Δ330-443 und HA-Sam68Δ410-443 hemmte die virale Replikation soweit, dass keine Gag-Expression nachweisbar war (Abb. 3.17, Balken 4 und 9). Die Expression der Mutanten HA-Sam68Δ321-330, HA-Sam68Δ321-410 und HA-Sam68Δ330-410 zeigte im Vergleich zu überexprimierten

HA-Sam68 eine deutliche Reduktion der Virusproduktion (Abb. 3.17, Balken 5, 6 und 8). Betrachtet man den Einfluss dieser Mutanten auf die virale Replikation, so war diese um das ~1.7-fache erniedrigt im Vergleich zum Ansatz mit Provirus ohne Deletionsmutanten (Abb. 3.17, Vergleich Balken 2 mit Balken 5, 6, 8). Wie im *gag*-Reportersystem (3.2.5.1) schien die zusätzliche Deletion der 9 Aminosäuren (321-330) in der HA-Sam68 Δ 321-443 Mutante den transdominant negativen Phänotyp der NLS-deletierten Sam68 Mutanten (vergleiche HA-Sam68 Δ 330-443 und HA-Sam68 Δ 410-443) auf die Virusreplikation aufzuheben (Abb. 3.17, Balken 7).

3.2.5.3 Funktionalität im Kompetitions-Assay

Da aus dem HIV-Replikations-Assay (3.2.5.2) nicht hervorgeht, ob die Mutanten Sam68 Δ 321-330, Sam68 Δ 321-410, Sam68 Δ 321-443 und Sam68 Δ 330-410 im Hinblick auf die HIV-Replikation funktionell sind und ob das endogen exprimierte Sam68 in diesem Kontext eine essentielle Funktion erfüllt, sollten diese Aspekte mit Hilfe des Kompetitions-Assays genauer untersucht werden. Hierzu wurde die Virusreplikation durch die Expression einer Sam68 Δ C-Mutante mit einem transdominant negativen Phänotyp herunterreguliert. Die Co-Expression von Sam68 bzw. den Sam68-Deletionsmutanten sollte zeigen, inwiefern diese fähig sind, den dominant-negativen Effekt auf die Virusreplikation zu komplementieren.

Zur Analyse wurden 293T-Zellen mit dem Provirus pNL4-3, dem Expressionsplasmid für die Sam68 Δ C-Mutante HA-Sam68 Δ 330-443 und den verschiedenen HA-Sam68-Deletionsmutanten sowie dem Wildtyp-Konstrukt HA-Sam68 im Verhältnis 1:8:8 co-transfiziert und nach 48 h der Zellüberstand im p24-ELISA (6.3.8) quantifiziert.

Die Expression von HA-Sam68 Δ 330-443 führte erwartungsgemäß zu einer drastischen Abnahme der Virusproduktion im Vergleich zu den Ansätzen mit dem Provirus bzw. dem Provirus und der HA-Sam68 Überexpression (Abb. 3.18, Vergleich Balken 4 mit 2 bzw. 3). Die Co-Expression von HA-Sam68 und HA-Sam68 Δ 321-330 in den HA-Sam68 Δ 330-443-behandelten Zellen resultierte in einer signifikanten Steigerung der Gag-Expression (Abb. 3.18, Balken 5 und 6). Interessanterweise konnten die Sam68 Mutanten mit Deletion des Rev-Bindebereichs (HA-Sam68 Δ 321-410, HA-Sam68 Δ 321-443, HA-Sam68 Δ 330-410) die Virusproduktion nicht wiederherstellen (Abb. 3.18, Balken 7-9). Dies spricht für eine essentielle Rolle der direkten Interaktion von Rev und Sam68 während der viralen Replikation (Diskussion in 4.2.4).

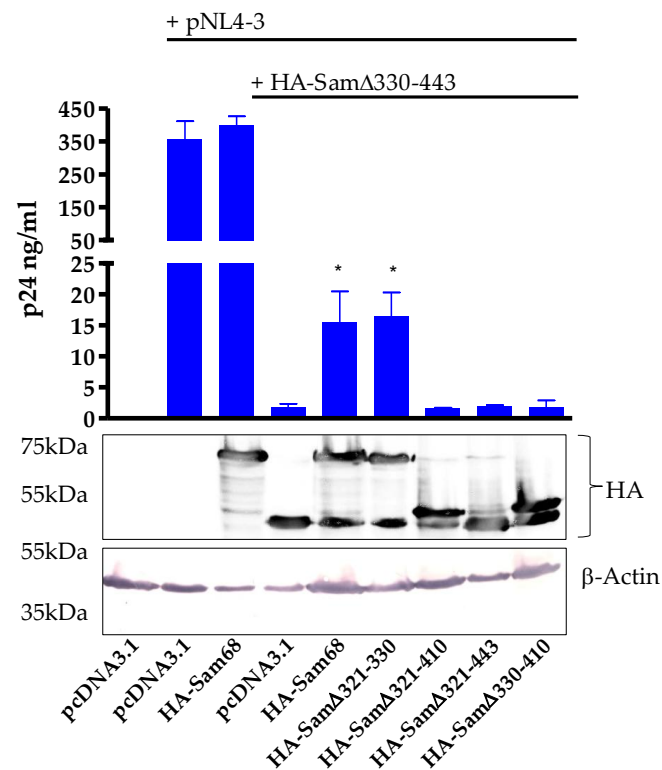


Abb. 3.18: Funktionelle Analyse der Sam68-Mutanten in einem HIV-Kompetitions-Assay.

293T-Zellen wurden mit DNA-Konstrukten für pcDNA3.1(+) (Negativkontrolle), pcDNA3.1(+) und pNL4-3, sowie HA-Sam68 und pNL4-3 co-transfiziert. Desweiteren wurden die DNA-Konstrukte für pNL4-3, HA-Sam68Δ330-443 und pcDNA3.1(+)/HA-Sam68 oder für die verschiedenen HA-Sam68-Deletionsmutanten im Verhältnis 1:8:8 (pNL4-3 : Sam68Δ330-443 : Sam68 WT/Mutante) co-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Gag-Expression (Virusgehalt) in den Kulturüberständen in einem p24-ELISA vermessen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Wiederherstellung der viralen Replikation durch HA-Sam68 bzw. HA-Sam68Δ321-330 ist statistisch signifikant (* $p < 0.02$, t-Test). Die Expression der HA-Sam68 Konstrukte wurde in den Zelllysaten mittels Western Blot-Analyse mit einem α -HA-spezifischen Antikörper (5.8) detektiert. β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.2.6 Subzelluläre Lokalisation der Sam68-Deletionsmutanten

Es ist bekannt, dass die Deletion des Kernlokalisierungssignals NLS in Sam68 zu einer Veränderung der zellulären Lokalisation vom Zellkern ins Cytoplasma führt (1.4.2). Desweiteren könnten auch andere Deletionen, die in die Sam68-Mutanten eingebracht worden sind, die Verteilung der Proteine innerhalb der Zelle verändern. Deswegen sollten alle Sam68 Konstrukte in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen analysiert werden. Hierfür wurden diese in das Expressionsplasmid pEYFP-C1 (5.5) kloniert, so dass die Proteine N-terminal mit dem YFP-tag fusioniert waren (5.6, 6.2.2.2). 293T-Zellen, welche zuvor auf Deckgläschen ausgesät worden waren, wurden mit den entsprechenden Konstrukten und zur Kontrolle mit pEYFP-C1 transfiziert und 48 h danach fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 3.19) (6.5.4). Die Emission von YFP konnte nach Anregung im FITC-Filter (grün) fotografiert werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau) und ermöglichten

bei Überlagerung beider Aufnahmen die Unterscheidung der Lokalisation zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma.

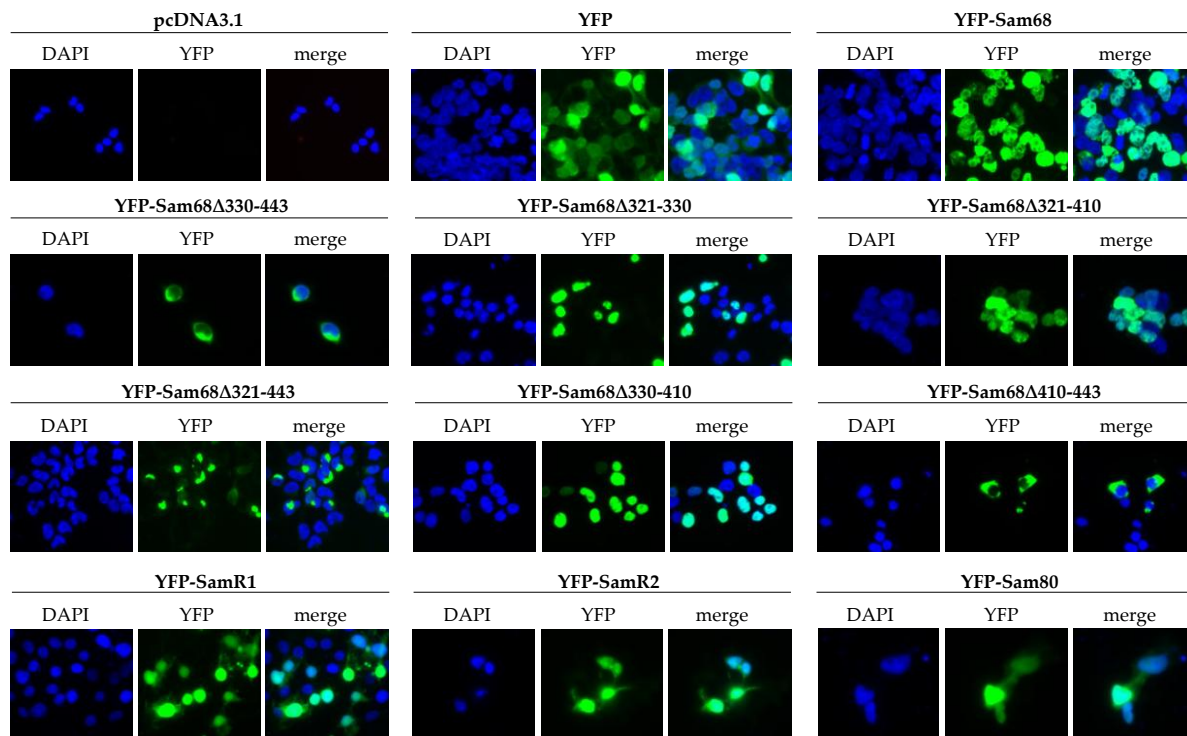


Abb. 3.19: Subzelluläre Lokalisation von YFP-Sam68 und den YFP-Sam68-Deletionsmutanten.

293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die angegebenen YFP-Fusionsproteine bzw. den Kontrollen pcDNA3.1(+) bzw. pEYFP-C1 auf Deckgläschen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert, DAPI-gefärbt und eingedeckt. Repräsentative Zellen wurden bei entsprechender Anregung im DAPI- und im FITC-Filter bei 630-facher Vergrößerung fotografiert. Gezeigt sind jeweils die Fluoreszenzen von DAPI und YFP sowie die Überlagerung beider Bilder.

YFP war, wie erwartet, innerhalb der Zelle gleichmäßig verteilt. Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren, zeigten keinerlei YFP-Fluoreszenz im FITC-Filter. Sam68 Mutanten (YFP-Sam68 Δ 330-443, YFP-Sam68 Δ 321-443 und YFP-Sam68 Δ 410-443), denen unter anderem das Kernlokalisierungssignal NLS entfernt wurde, waren, wie in Abbildung 3.19 ersichtlich, aus dem Zellkern ausgeschlossen. Der Wildtyp YFP-Sam68 befand sich erwartungsgemäss im Zellkern, wie die Überlagerung mit dem DAPI-Bild zeigt. YFP-Sam68 Δ 321-330, YFP-Sam68 Δ 321-410 und YFP-Sam68 Δ 330-410 zeigten trotz ihrer Deletionen das gleiche nucleäre Lokalisationsmuster wie YFP-Sam68. Die Mutanten YFP-Sam80 (37 kDa), YFP-SamR1 (32 kDa) und YFP-SamR2 (33 kDa) wiesen aufgrund ihres geringen Molekulargewichts, welches ihnen eine freie Diffusion durch die Kernporen ermöglicht, eine gleichmäßige Verteilung in der Zelle auf.

3.3 Gerichtete Evolution hochaffiner Sam68-Liganden

Um zu beantworten, ob ein therapeutischer Eingriff in den HIV-Krankheitsverlauf auf der Rev/Sam68-Ebene überhaupt möglich ist, sollten gezielt transdominante Inhibitoren entwickelt werden, welche die Rev/Sam68-Interaktion beeinflussen. Hierfür war die Analyse der an der Interaktion beteiligten Domänen beider Proteine unerlässlich. Die Sam68-Bindestelle in Rev wurde auf ein strukturelles Motiv aus den Regionen AS 18-24, AS 54-60 und AS 64-116 eingegrenzt. Der Rev-Bindebereich in Sam68 hingegen auf ein lineares Motiv (SamR2 Aminosäuren 364-410). Da es wesentlich erfolgsversprechender ist, eine lineare Region zu randomisieren, und die Immunogenität gegenüber einem zellulären Protein im Vergleich zu einem viralen Protein sehr unwahrscheinlich ist, wurde entschieden die Region AS 364-410 in Sam68 einer gerichteten Evolution zur Entwicklung hochaffiner Sam68-Liganden zu unterziehen.

3.3.1 Herstellung einer SamR2-Bibliothek

Die Selektion hochaffiner Sam68-Liganden setzt die Generierung einer Varianten-Bibliothek voraus. Je nach vorliegenden Informationen bezüglich der zu evolvierenden Region eines Proteins gibt es zahlreiche Mutationsstrategien zur Herstellung einer Bibliothek. Da im SamR2-Peptid nicht genau bekannt war, welche Aminosäuren gezielt zur Rev-Interaktion beitragen bzw. für diese wichtig sind, wurde hier eine zufällige Mutagenese durchgeführt. Hierfür wurden degenerierte Oligonucleotide bestellt (Ella Biotech GmbH, Martinsried), die nach dem „dirty bottle approach“ generiert wurden. Während der Herstellung dieser degenerierten Oligonucleotide liegt bei jedem Syntheseschritt für jede Nucleotidposition überwiegend die Wildtyp-Base, jedoch auch eine Mischung der anderen drei Nucleotide vor. Unter Berücksichtigung der Länge des zu randomisierenden Bereichs und der Anzahl der Mutationen ergibt sich ein bestimmtes Mischungsverhältnis für die Nucleotide und daraus die Wahrscheinlichkeit für die Mutation. Im konkreten Fall wurde zur Mutagenese des 47-Aminosäuren langen SamR2-Peptids eine Mutationsrate von vier Aminosäuren-Substitutionen pro Konstrukt angestrebt. Mit einem von der Firma Geneart speziell für die Genoptimierung entwickelten Programm wurde das optimale Mischungsverhältnis für die Zusammensetzung der degenerierten Oligonucleotide errechnet. Somit sollten während der Oligonucleotidsynthese für das SamR2-Peptid bei 95.2 % der Moleküle das Wildtyp-Nucleotid und bei 4.8 % der Moleküle eine der drei anderen Nucleotide eingebaut werden,

was in einer theoretischen Bibliothekgrösse von 1.4×10^{62} möglichen Varianten resultierte. Die Prozentsätze können zwar variabel verändert werden, wobei darauf zu achten war, dass die Mutationsrate nicht zu hoch ausfiel. Mit diesem Ansatz sollten im Schnitt vier Aminosäuren pro Konstrukt substituiert werden.

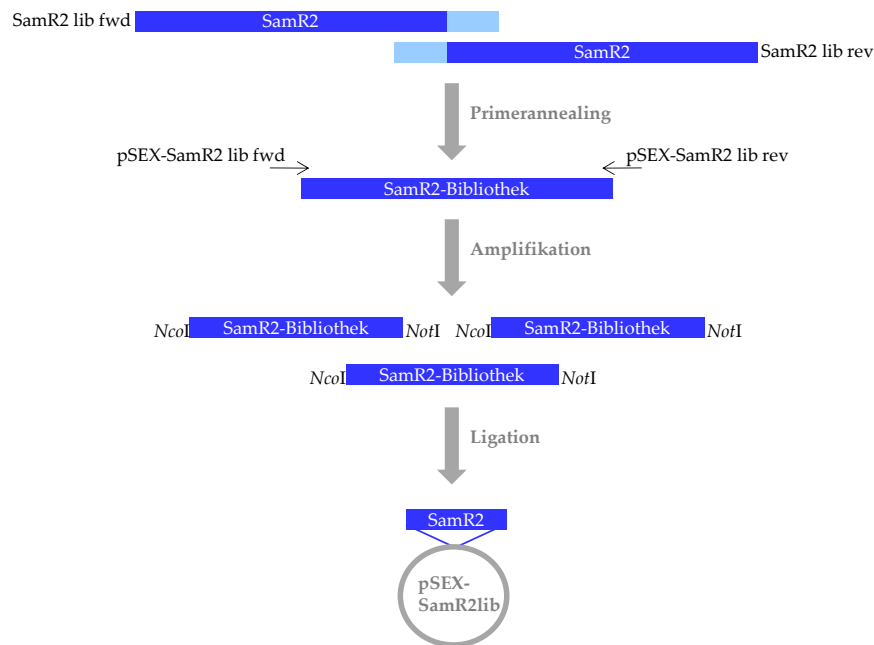


Abb. 3.20: Generierung der SamR2-Bibliothek. Zur Erläuterung der einzelnen Schritte siehe Text.

In Abbildung 3.20 ist die Generierung der SamR2-Bibliothek schematisch dargestellt. Zunächst wurden die degenerierten Oligonucleotide SamR2 lib fwd und SamR2 lib rev (5.6), welche jeweils mit einem komplementären Überhang konstruiert worden waren, über eine Primerannealing-Reaktion (6.2.4) fusioniert. Anschliessend wurde das Produkt mit den Oligonucleotiden pSEX-SamR2 lib fwd und pSEX-SamR2 lib rev (5.6) in einer PCR amplifiziert. Gleichzeitig wurden über diese Oligonucleotide die Schnittstellen *NcoI* und *NotI* in die SamR2-Sequenz eingebracht. Das PCR-Produkt wurde im nächsten Schritt für ein monovalentes Display (1.5.2) in das Phagemid pSEX81 (5.5) ligiert (6.2.6.2) und in den *E.coli* K12-Stamm TG1, welcher speziell für die Vermehrung von Bakteriophagen entwickelt wurde, elektroporiert (6.2.6.4). Die Ansätze, sowie zusätzliche Verdünnungsreihen zur Bestimmung der Transformationseffizienz, wurden auf SOBAG-Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden die Kolonien zur Produktion des Phagenüberstands herangezogen. Durch Auszählen der Klone der Verdünnungsreihen wurde die Grösse der Bibliothek ermittelt. Nach Optimierung der einzelnen Schritte konnte eine tatsächliche Bibliothekgrösse von 1.26×10^7 Varianten erreicht werden.

Im Anschluss wurden die Kolonien mit YT-AG-Medium abgespült und wie in 6.4.2 beschrieben unter Einsatz des Helferphagen M13K07 oder des Hyperphagen ein Phagenüberstand hergestellt. Die Produktionszeit wurde auf 5 h begrenzt, um zu verhindern, dass einzelne Phagenvarianten überproportional stark repräsentiert werden. Für den Phagenüberstand, welcher mit dem M13K07-Helferphagen hergestellt worden ist, wurde nach der Titerbestimmung (6.4.3) ein Wert von 6.9×10^{11} cfu/ml bestimmt. Die Titration des mit dem Hyperphagen produzierten Phagenüberstands ergab einen Wert von 1.2×10^{11} cfu/ml.

3.3.2 Qualitätskontrolle der Bibliothek

Zur Qualitätssicherung der hergestellten SamR2-Bibliothek wurden von den Platten zur Transformationseffizienzbestimmung 28 Phagemide aus Einzelklonen isoliert und die randomisierte SamR2-Region sequenziert.

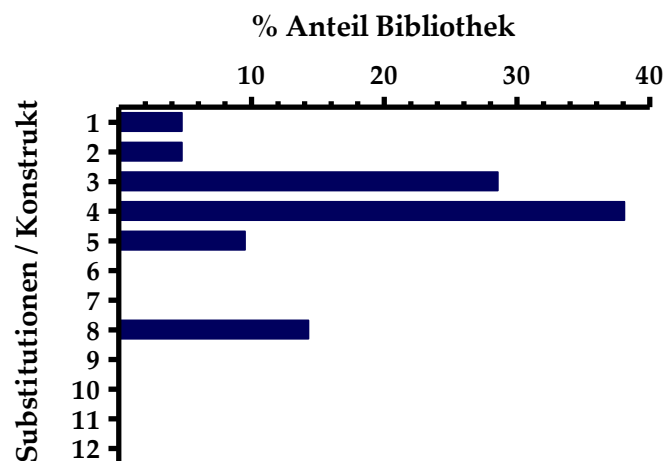


Abb. 3.21: Graphische Darstellung der Verteilung der Substitutionen im Bezug auf den prozentualen Anteil der SamR2-Bibliothek.

In Abbildung 3.21 ist die Anzahl der Aminosäuren-Substitutionen pro Konstrukt gegen den prozentualen Anteil in der Bibliothek aufgetragen. Dabei ist klar erkennbar, dass die Bibliothek das erwartete und errechnete Mittel von vier Substitutionen pro Konstrukt erfüllte.

Die weitere Analyse ergab, dass im Schnitt von den 28 sequenzierten Klonen 43 % unterschiedliche Sequenzen aufwiesen und 32 % der 28 Klone ein vorzeitiges Stopp-Codon enthielten. Bei den restlichen 25 % wurde ein Leserastersprung, der zur Veränderung des Leserahmens führte, diagnostiziert oder sie waren nicht lesbar. Zwar war die Diversität der Bibliothek nicht optimal, da aber zu 43 % unterschiedliche Sequenzen erhalten wurden und

die erwartete Substitutionsrate von vier Aminosäuren pro Konstrukt bestätigt werden konnte, wurde die Bibliothek mit einer effektiven Anzahl von 5.42×10^6 Varianten dennoch für das Bio-Panning eingesetzt.

Die SamR2-Bibliothek wurde ebenfalls für ein polyvalentes Display (1.5.2) analog zu 3.3.1 in das Phagemid pJH (5.5) kloniert. Die Diversität dieser Bibliothek war trotz verschiedener Optimierungsschritte (z.B. Inkubation der SOBAG-Platten bei 30°C statt bei 37°C um die Wachstumsrate langsam und schnell wachsender Varianten anzugleichen) stets suboptimal (Daten nicht gezeigt). Es wurden sehr wenige unterschiedliche Sequenzen erhalten, die hauptsächlich mit einer Verschiebung des Leserahmens verbunden waren. Varianten ohne Leserastersprung hatten oft ein vorzeitiges Stopp-Codon im Leserahmen. Um zu überprüfen, ob die suboptimale Diversität der Bibliothek Vektorabhängig war, wurde das randomisierte SamR2 PCR-Produkt in einen weiteren Vektor (*StrataClone PCR Cloning Vector*, 5.3) kloniert. Die Sequenzierung von mehreren Einzelklonen ergab eine deutlich höhere Diversität. Somit schien das pJH-Phagemid bzw. die Klonierung der SamR2-Bibliothek in pJH die Diversität der Bibliothek negativ zu beeinflussen. Desweiteren wurde der Wildtyp SamR2 in Fusion mit dem p8-Oberflächenprotein des Phagen (5.6, 6.2.2.3) nicht korrekt auf der Phagenoberfläche abgebildet (Daten nicht gezeigt). Aufgrunddessen wurde ein Bio-Panning im polyvalenten Display nicht durchgeführt.

3.3.3 Bio-Panning zur Selektion hochaffiner SamR2-Liganden

In Abbildung 3.22 ist der Zyklus eines Bio-Pannings (6.4.5) dargestellt. Ursprünglich wurde das Protokoll für dieses Verfahren von K. Saksela entwickelt. Weitere Optimierungen folgten in der Arbeitsgruppe Wagner ²¹⁹⁻²²¹.

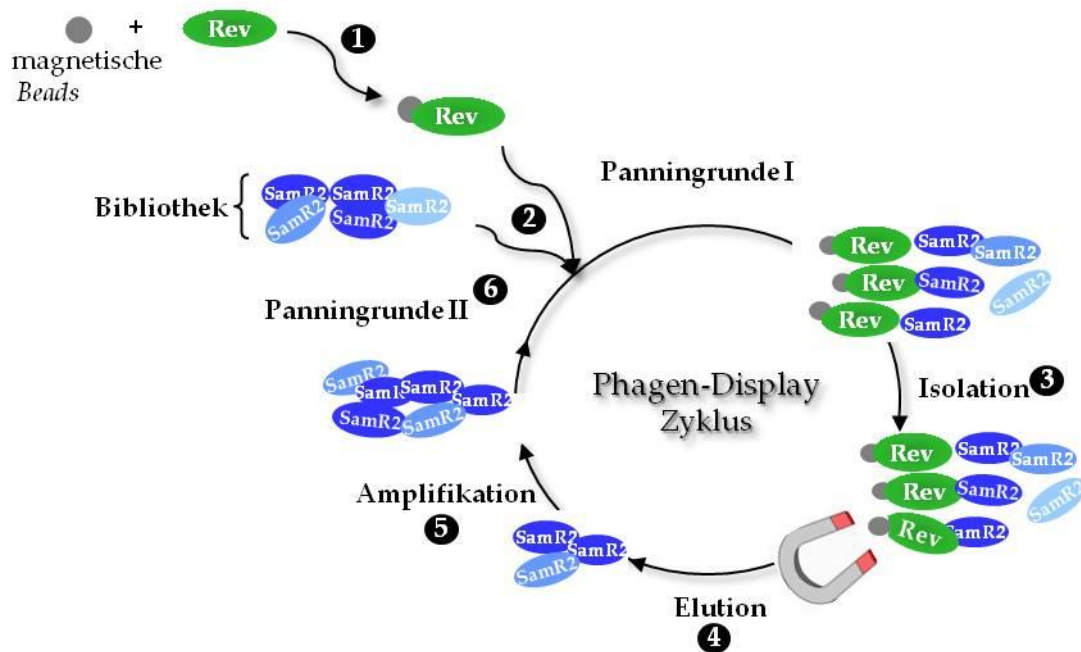


Abb. 3.22: Darstellung des Phagen-Display Zyklus.

Rev wurde als Zielprotein an magnetischen *Epoxy-Beads* immobilisiert (1) und mit der SamR2-Phagenbibliothek ($>10^9$ cfu) inkubiert (2). Die Rev-SamR2-Phagen-Komplexe wurden zur Isolation (3) mit einem Magneten fixiert und nicht gebundene Phagen durch Waschen entfernt. Die Rev-bindenden Phagen wurden durch pH-Wert-Erniedrigung eluiert (4) und zur Infektion von *E. coli* eingesetzt. So wurden die Phagen direkt für eine Folgerunde amplifiziert (5) und erneut in den Phagen-Display Zyklus eingesetzt (6).

Im ersten Schritt des Verfahrens wurden $10\ \mu\text{g}$ rekombinant hergestelltes, aufgereinigtes GST-Rev bzw. GST kovalent an magnetische *Epoxy-Beads* gebunden. Der Vorteil von magnetischen *Beads* liegt zum einen in der effizienteren und ungerichteten Bindung aufgrund einer größeren und besser zugänglichen Bindungsfläche, zum anderen in der einfachen und kontaminationsfreien Handhabung im Vergleich zu herkömmlichen Plastik-Mikroplatten^{220,222}. Anschliessend wurden diese nach Absättigung unspezifischer Bindestellen einerseits mit der SamR2-Phagenbibliothek, welche mit dem Helferphagen M13K07 hergestellt worden war, andererseits mit der SamR2-Phagenbibliothek, für die der Hyperphage verwendet worden war, inkubiert. Die Isolation der gebundenen Phagen erfolgte mit Hilfe eines Magneten, so dass ungebundene Phagen durch Waschen entfernt werden konnten. Durch einen pH-Sprung in den sauren Bereich wurden die gebundenen Phagen eluiert und direkt durch Infektion von *E. coli* TG1-Zellen amplifiziert werden. Die so produzierten Phagenüberstände wurden anschliessend in eine weitere Panningrunde eingesetzt. Insgesamt konnten auf diese Weise sechs Panningrunden durchgeführt werden. Eine Affinitätssteigerung der Phagenüberstände in den einzelnen Runden wurde im Phagen-ELISA (6.4.6) kontrolliert. Sobald in einer Panningrunde die Affinität höher ausfiel als die des Wildtypproteins SamR2 (Positivkontrolle) wurden Einzelklone isoliert und sequenziert.

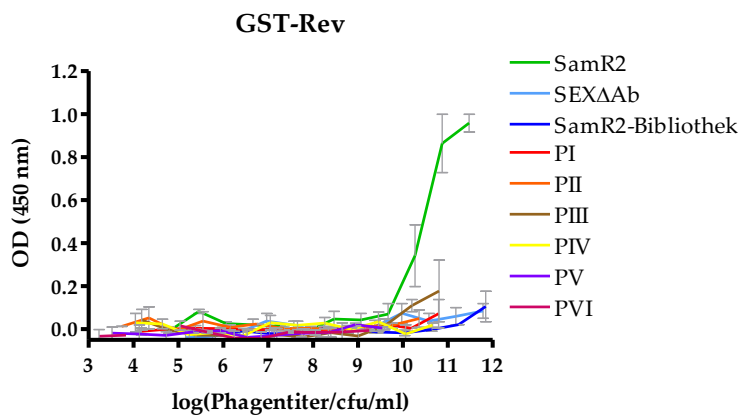
3.3.3.1 Panning mit der SamR2_{M13K07}-Phagenbibliothek

Die SamR2-Phagenbibliothek, welche mit dem Helferphagen M13K07 produziert wurde, bildete Varianten von SamR2 als C-terminale Fusion mit dem Oberflächenprotein p3 des Bakteriophagen M13K07. Da der Helferphage zusätzlich noch für das Wildtypprotein p3 codiert, waren ebenfalls reine p3-Proteine ohne Fusion auf der Phagenoberfläche vertreten. Wie bereits erwähnt, sollte eine Affinitätssteigerung in den einzelnen Panningrunden mit dem Phagen-ELISA (6.4.6) kontrolliert werden. Hierfür wurden 2 µg des rekombinant hergestellten GST-Rev bzw. GST Proteins an der ELISA-Platte gebunden und nach Absättigung unspezifischer Bindestellen mit einem *Blocking*-Reagenz mit den produzierten Phagenüberständen aus den Panningrunden I-VI inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte mit einem spezifischen α -M13-Antikörper (5.8). Wird die Absorption gegen den Phagentiter (cfu/ml) aufgetragen, ergibt sich bei halblogarithmischer Auftragung eine sigmoide Kurve einer typischen Rezeptor-Ligand-Interaktion in Analogie zur Michaelis-Menten-Kinetik.

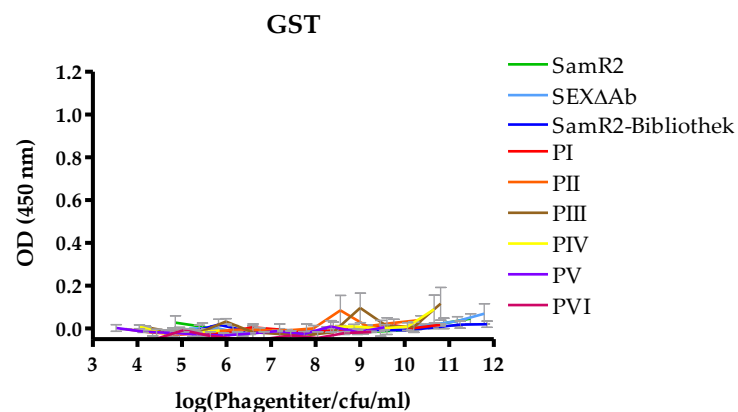
In Abbildung 3.23a sind die Bindungskurven aus den Panningrunden I-VI dargestellt. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle (Abb. 3.23a, hellblaue Kurve) ein Phagenüberstand erstellt, der auf dem Phagemid pSEX Δ Ab (6.2.2.3, 5.6) basiert. Das ursprüngliche Phagemid pSEX81 (5.5) ist ein Vektor mit einer Expressionskassette für die Präsentation von funktionellen scFv-Antikörper-p3 Fusionsproteinen auf der Oberfläche des Bakteriophagen M13. pSEX Δ Ab wurde speziell hierfür durch die Deletion der für scFv (*single chain variable fragment*)-Fragmente codierenden Region konstruiert, so dass auf der Phagenoberfläche nur das p3-Protein abgebildet wurde. Der Phagenüberstand „SamR2“ (6.2.2.3, 5.6) repräsentiert die Bindungsaffinität des Wildtypproteins SamR2 zu GST-Rev (Abb. 3.23a, grüne Kurve). Die dunkelblaue Kurve „SamR2-Bibliothek“ (Abb. 3.23a) präsentiert die Bindung des Phagenüberstands, mit dem das Bio-Panning begonnen wurde. Hier wurde zunächst keine höhere Affinität erwartet, da in der randomisierten Bibliothek natürlich überwiegend Binder vorhanden sind, die eine geringere Affinität haben und somit das Signal unterdrücken. Eine Anreicherung hochaffiner Binder in den einzelnen Panningrunden würde in einer vertikalen Verschiebung der Bindungskurven, ausgehend von SamR2 nach links, zu geringeren Phagentitern resultieren. Dies war aber in keiner Panningrunde der Fall. Um ein unspezifisches Signal auszuschließen, wurde die Bindung der Phagenüberstände aus den Panningrunden I-VI, sowie des SamR2-, Sex Δ Ab- und des SamR2-Bibliothek-

Phagenüberstands an rekombinant hergestelltes GST in einem weiteren Phagen-ELISA (Abb. 3.23b) untersucht.

a)



b)



c)

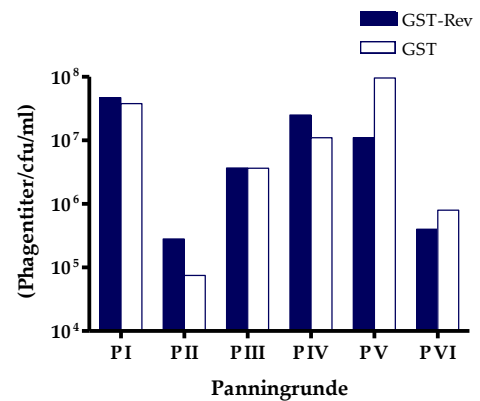


Abb. 3.23: Analyse der einzelnen Panningrunden mit der randomisierten SamR2_{M13K07}-Bibliothek.

a) und b) Phagen-ELISA zur Abschätzung der Bindungsaffinitäten der eluierten Phagen aus den Panningrunden I-VI.

Je 2 µg rekombinant hergestelltes GST-Rev bzw. GST (zur Kontrolle unspezifischer Bindung) wurde an die *wells* einer 96-*well* ELISA-Platte gebunden. Nach Inkubation mit Verdünnungsreihen der Phagenüberstände aus den einzelnen Panningrunden wurde zur Detektion gebundener Phagen ein HRP-gekoppelter α-M13-Antikörper zugegeben und der ELISA mit TMB-Substratlösung entwickelt. Die erhaltenen OD (450 nm)-Werte wurden normiert und gegen den Logarithmus des Phagentiters aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen ELISAs. Als Negativkontrolle diente SEXΔAb (hellblaue Kurve). Der Wildtyp SamR2 (grüne Kurve) diente als Referenz.

c) Vergleich der Phagentiter aus den Panningrunden I-VI.

Dargestellt sind jeweils die Phagentiter der eluierten Phagen aus den einzelnen Panningrunden des Bio-Pannings mit GST-Rev und GST.

Die Verwendung von magnetischen *Beads* ermöglicht die ungerichtete Bindung der Proteine an verschiedensten Stellen der Matrix, wodurch alle potentiellen Bindestellen für Phagen zugänglich sind. Trotzdem binden vermutlich auch Phagen unspezifisch an den GST-Anteil. Daher wurde das Bio-Panning zur weiteren Kontrolle parallel mit GST durchgeführt und in jeder Runde die Phagentiter der von den GST-Rev- bzw. GST-gebundenen *Beads* eluierten Phagen (6.4.5 Aliquot #2) bestimmt. In Abbildung 3.23c sind diese für die Panningrunden I-

VI im Vergleich dargestellt. Der Titer des GST-Rev-Phagenüberstands war stets ein wenig höher, als der des GST-Phagenüberstands (Abb. 3.23c, PI, PII, PIV). Dadurch konnte eine unspezifische Anreicherung ausgeschlossen werden. In den Panningrunden V und VI (Abb. 3.23c, PV, PVI) war der GST-Phagentiter deutlich höher als der GST-Rev-Phagentiter, was für eine Anreicherung Rev-unspezifischer SamR2-Binder sprechen würde.

Zusammenfassend konnten mit der SamR2_{M13K07}-Phagenbibliothek keine hochaffinen Binder angereichert werden.

3.3.3.2 Panning mit der SamR2_{Hyperphage}-Phagenbibliothek

Analog zu 3.3.3.1 wurde eine SamR2-Phagenbibliothek mit einem entsprechenden Helferphagen, dem Hyperphagen, produziert. Aufgrund einer Deletion der für das p3-Protein codierenden Region im Hyperphagen, wurden Varianten von SamR2 nur als C-terminale Fusion mit dem Oberflächenprotein p3 des Bakteriophagen auf der Phagenoberfläche abgebildet und kein freies p3 wie im M13K07-System. Eine Affinitätssteigerung in den einzelnen Panningrunden wurde ebenfalls wie in 3.3.3.1 beschrieben mit dem Phagen-ELISA kontrolliert.

Wie in Abbildung 3.24a dargestellt, zeigte sich in den Panningrunden bereits eine leicht erhöhte Affinität der Gesamtmischung einzelner Binder, deren Signal jedoch durch das Vorhandensein weniger affiner Varianten im Phagenüberstand unterdrückt wurde. Die vertikale Verschiebung der Bindungskurve, ausgehend von SamR2 nach links, in der fünften Panningrunde liess auf höher affine Binder im Phagenüberstand schliessen (Abb. 3.24a, lila Kurve). Um ein unspezifisches Signal auszuschliessen, wurde auch hier die Bindung der Phagenüberstände aus den Panningrunden I-VI, sowie des SamR2-, SexΔAb- und des SamR2-Bibliothek-Phagenüberstands an rekombinant hergestelltes GST in einem weiteren Phagen-ELISA (Abb. 3.24b) untersucht.

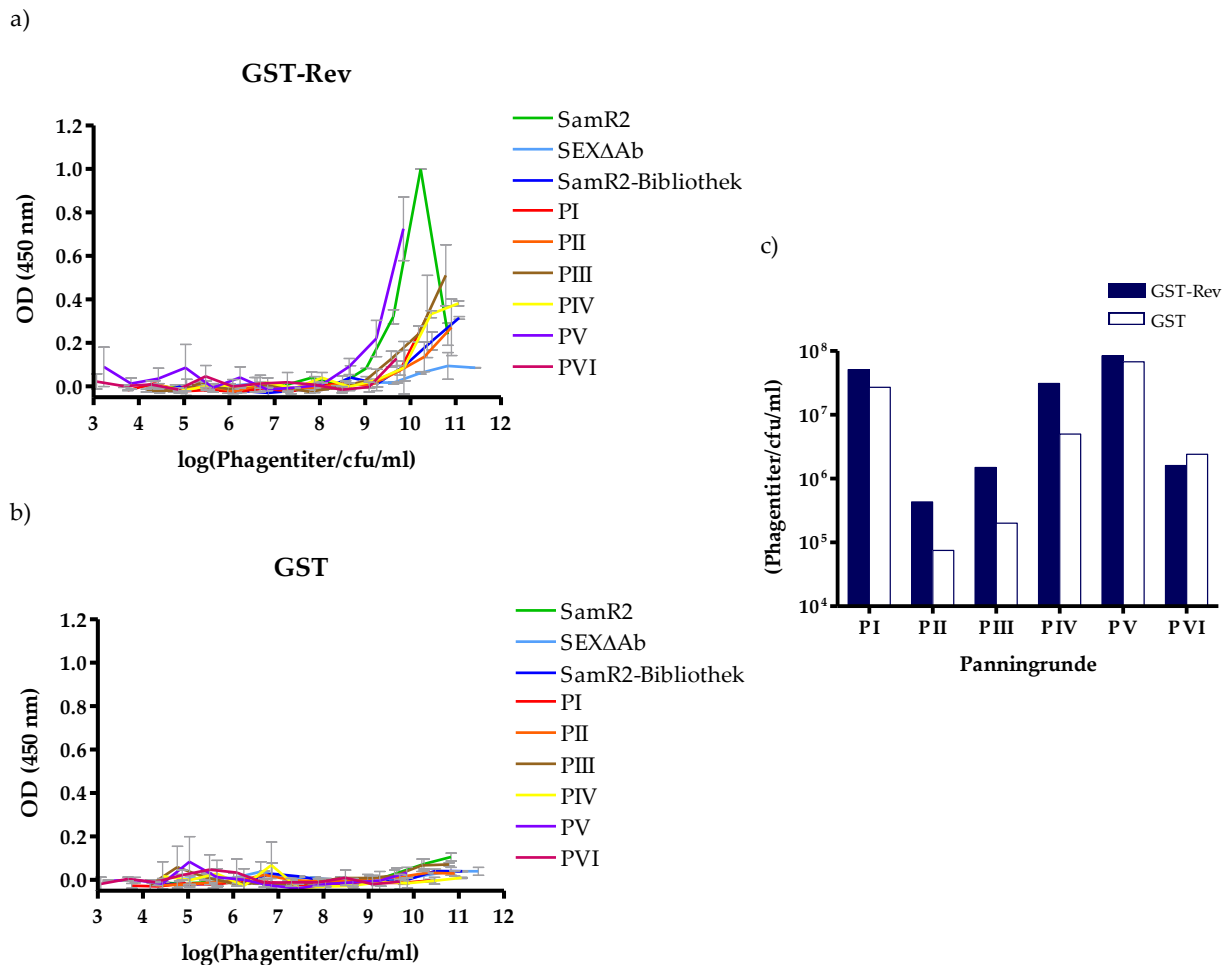


Abb. 3.24: Analyse der einzelnen Panningrunden mit der randomisierten SamR2^{Hyperphage}-Bibliothek.

a) und b) Phagen-ELISA zur Abschätzung der Bindungsaffinitäten der eluierten Phagen aus den Panningrunden I-VI. Je 2 µg rekombinant hergestelltes GST-Rev bzw. GST (zur Kontrolle unspezifischer Bindung) wurde an die *wells* einer 96-*well* ELISA-Platte gebunden. Nach Inkubation mit Verdünnungsreihen der Phagenüberstände aus den einzelnen Panningrunden wurde zur Detektion gebundener Phagen ein HRP-gekoppelter α -M13-Antikörper zugegeben und der ELISA mit TMB-Substratlösung entwickelt. Die erhaltenen OD (450 nm)-Werte wurden normiert und gegen den Logarithmus des Phagentiters aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen ELISAs. Als Negativkontrolle diente SEX Δ Ab (hellblaue Kurve). Der Wildtyp SamR2 (grüne Kurve) diente als Referenz.

c) Vergleich der Phagentiter aus den Panningrunden I-VI.

Dargestellt sind jeweils die Phagentiter der eluierten Phagen aus den einzelnen Panningrunden des Bio-Pannings mit GST-Rev und GST.

Der Vergleich der Phagentiter der von den GST-Rev- bzw. GST-gebundenen *Beads* eluierten Phagen in Abbildung 3.24c zeigte in den Panningrunden I-V einen um den Faktor 1.2 bis 7.5 (im Mittel 4.5) höheren GST-Rev-Titer (PI-PV). Lediglich in der sechsten Runde war der GST-Titer gegenüber dem GST-Rev-Titer erhöht (Abb. 3.24c, PVI). Hier erfolgte eine Anreicherung Rev-unspezifischer SamR2-Binder, was sich auch mit dem Ergebnis des Phagen-ELISA (Abb. 3.24a, PVI: pinke Kurve) deckt.

Aus dem Phagenüberstand der fünften Panningrunde, die eine höhere Bindungsaffinität als der Wildtyp SamR2 aufwies, sollte anschliessend mit Hilfe der Isolierung und

Sequenzierung von Einzelklonen auf die Sequenz der hochaffinen Binder rückgeschlossen werden.

3.3.4 Analyse einzelner Binder

Aus der fünften Panningrunde wurden insgesamt 80 Einzelklone isoliert und sequenziert. Diese wurden anschliessend nach der Häufigkeit, mit der sie bei der Sequenzierung repräsentiert sind, zu den Gruppen GI-GXII zusammengefasst. In Abbildung 3.25 sind die Aminosäuresequenzen der einzelnen Gruppen dargestellt. SamR2 repräsentiert die Wildtyp Ausgangssequenz.

SamR2	ETYE ^E EY ^G YDDTYAE ^Q SYEGY ^E EGYYSQS ^Q GDSEY ^Y DYGHGEV ^Q DSYEA	
GI	..Q.....KK.....K.....	(3)
GII	V...G...H...TA.....V...L.....Q.....A	(7)
GIII	.SF.....KQ...R...D.....	(6)
GIVG.....Q.....H.....	(6)
GVD.....SA..Q.....R.R.....KAT...	(5)
GVIP.....QD..K.....HG.F..	(3)
GVIIQ...P.....K.....H..	(2)
GVIIIR.....G.....V..G.....V..V.....	(1)
GIXH.....*	(10)
GX	..CA.....S.....Q.....EV.....	(1)
GXI	D.....S.....VAKKAITARVK.TQNIMTMDM.RFKFV*SC	(4)
GXIIH.....H.....Q.....K	(1)

Abb. 3.25: Darstellung der Aminosäuresequenzen der analysierten Binder GI-GXII.

Die Zahl in Klammern gibt die Häufigkeit des Auftretens der jeweiligen Sequenz an. Die restlichen 31 Klone konnten aufgrund von Mischsequenzen nicht ausgewertet werden.

Um die Bindung der SamR2-Varianten an Rev quantitativ zu beurteilen, wurden Einzelphagenüberstände (6.4.2) der analysierten Binder GI-GXII hergestellt und ihre Bindungsaffinität im Phagen-ELISA (6.4.6) untersucht. Da alle Varianten bis auf GXI im Vergleich zum Wildtyp SamR2 keine höher affine Bindung zeigten, wurden aus Übersichtsgründen nur die Daten für den Klon GXI in der Abbildung 3.26 abgebildet. Dieser zeigte eine höhere Affinität zu GST-Rev als der Wildtyp SamR2 (Abb. 3.26, lila und grüne Kurve), hatte aber auch einen deutlich niedrigen Phagentiter. Eine unspezifische Bindung konnte durch Inkubation der Phagenüberstände mit GST (Abb. 3.26, hellgrüne, hellblaue

und rosa Kurve), sowie mit dem Phagenüberstand SEX Δ Ab an GST-Rev (Abb. 3.26, blaue Kurve) ausgeschlossen werden.

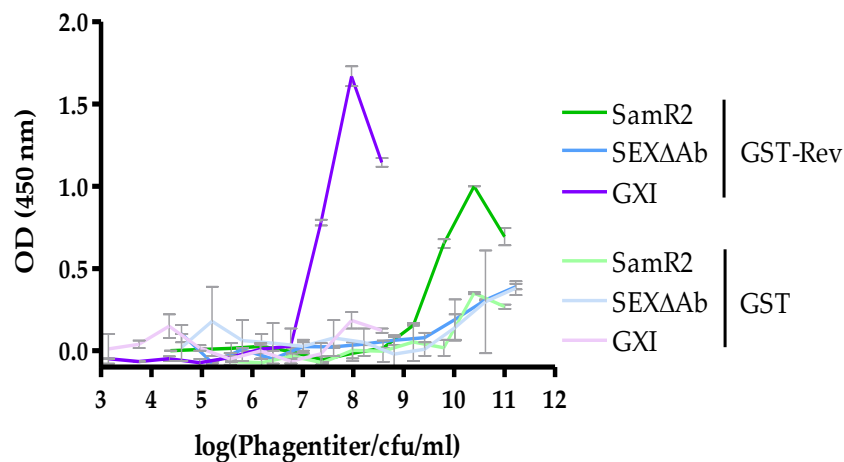


Abb. 3.26: Phagen-ELISA zur Abschätzung der Bindungsaffinität des Binders GXI.

Je 2 μ g rekombinant hergestelltes GST-Rev bzw. GST (zur Kontrolle unspezifischer Bindung) wurde an die *wells* einer 96-*well* ELISA-Platte gebunden. Nach Inkubation mit Verdünnungsreihen der Phagenüberstände wurde zur Detektion gebundener Phagen ein HRP-gekoppelter α -M13-Antikörper zugegeben und der ELISA mit TMB-Substratlösung entwickelt. Die erhaltenen OD (450 nm)-Werte wurden normiert und gegen den Logarithmus des Phagentiters aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen ELISAs. Als Negativkontrolle diente SEX Δ Ab (hellblaue Kurve). Der Wildtyp SamR2 (grüne Kurve) diente als Referenz.

3.3.5 Charakterisierung des hochaffinen Klons GXI

Da GXI im Phagen-ELISA eine höhere Affinität als SamR2 zu Rev gezeigt hatte, sollte die Sequenz genauer analysiert werden. In Abbildung 3.27a und b sind die Aminosäuresequenzen des Wildtyps SamR2 und des Klons GXI im Vergleich dargestellt.

a) Aminosäuresequenz SamR2

E T Y E E Y G Y D D T Y A E Q S Y E G Y E G Y Y S Q S Q G D S E Y Y D Y G H G E V Q D S Y E A

b) Aminosäuresequenz GXI

D T Y E E Y G Y D D S Y A E Q S Y V A K K A I T A R V K G T Q N I M T M D M G R F K F V * S C

Leseraster korrekt Deletion (-A) Leserasterverschiebung Deletion (-A)

c) Aminosäuresequenz GXI*

D T Y E E Y G Y D D S Y A E Q S Y V A K E G Y Y S Q S Q G D S E Y Y D Y G H G E V Q D S Y E A

Insertion (+G) Wiederherstellung des Leserasters Insertion (+A)

Abb. 3.27: Darstellung der Aminosäuresequenzen von SamR2, GXI und GXI*.

a) Die Ausgangsaminosäuresequenz des Wildtyps SamR2 vor Randomisierung.

b) Die Aminosäuresequenz des isolierten und höher affinen Klons GXI. Die Aminosäuresubstitutionen sind an den entsprechenden Stellen lila unterstrichen. Aufgrund zweier Basendeletionen (Adenin des E18 und des D43) kommt es zu zwei Verschiebungen im Leseraster, wobei die Zweite zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führt.

c) Die Aminosäuresequenz des Klons GXI* nach Wiederherstellung des Leserasters. Die Substitutionen der Aminosäuren sind an den entsprechenden Stellen lila unterstrichen. Durch Insertion von zwei Basen (Guanin in

E21 und Adenin in D43) wurde der Leserahmen des Klons GXI wieder hergestellt. Die Substitutionen E1D und T11S wurden beibehalten, neu eingeführt wurden E18V, G19A und Y20K.

Die Substitution des Adenins zu Thymin an dritter Position des Triplet-Codes im Glutamat 1 resultierte in der Aminosäure Aspartat (E1D). Desweiteren wurde das Tyrosin 11 aufgrund der Substitution von Adenin zu Thymin an erster Stelle des Triplet-Codes durch ein Serin ersetzt (T11S). Die Deletion des Adenins an dritter Stelle des Codons für Glutamat 18 führte zu einer Leserasterverschiebung beginnend mit der Aminosäure Valin (E18V). Zusätzlich erfolgte eine zweite Verschiebung des Leserasters durch die Deletion eines Adenins an zweiter Position im Code für die Aminosäure Aspartat 43 in der Wildtyp-Sequenz. Dies führte letztendlich zu einem vorzeitigen Stopp-Codon (TGA) im Leserahmen des Fusionproteins GXI-p3. Folglich hätte das Oberflächenprotein p3, welches für eine erfolgreiche Infektion der *E.coli*-Zellen und Präsentation des Fusionsprodukts GXI-p3 auf der Phagenoberfläche essentiell ist (1.5.1), nicht gebildet werden dürfen. Dieses Phänomen wird aber manchmal im Phagen-Display beobachtet (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Dübel, Institut für Biotechnologie, Tech. Universität Braunschweig), denn *E.coli* besitzen die Fähigkeit durch ribosomale Leserasterverschiebung ein Quadruplett zu de-codieren. Das würde bedeuten, dass ebenfalls zu einem gewissen Prozentsatz Varianten mit einem funktionellen p3-Protein gebildet worden sind, die zu infektiösen Phagenpartikel führten. Um dies zu überprüfen, wurden die produzierten Phagenüberstände durch eine PEG-Fällung (6.4.4) aufkonzentriert und auf die Expression des p3-Proteins in einer Western Blot-Analyse mit einem spezifischen α -p3 Antikörper (5.8) untersucht.

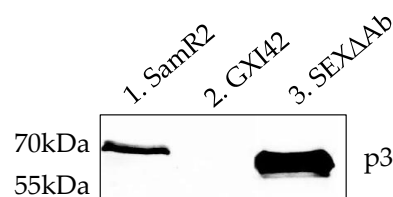


Abb. 3.28: Nachweis der p3-Expression in den Phagenüberstände SamR2, GXI und SEXΔAb.

Es wurden jeweils 25 μ l der aufkonzentrierten und mit 2x SDS-Probenpuffer versetzten Phagenüberstände in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in anschliessender Western Blot-Analyse mit einem α -p3-spezifischen Antikörper detektiert.

Wie in Abbildung 3.28 (Spur 1 und 3) gezeigt, konnte das p3-Protein im SamR2- (tatsächliches Molekulargewicht 51 kDa, Laufhöhe ~70 kDa), und auch im SEXΔAb- (tatsächliches Molekulargewicht 45 kDa, Laufhöhe ~63 kDa) Phagenüberstand nachgewiesen werden. Das p3-Protein von GXI wurde nicht detektiert (Abb. 3.28, Spur 2). Vermutlich war

der prozentuale Anteil der Varianten mit einem korrekten p3-Protein nicht hoch genug, um im Western Blot detektiert werden zu können.

Um die Sequenz, welche zu der hochaffinen Interaktion mit Rev führt, weiter zu analysieren, wurde ausgehend von der Sequenz von GXI eine weitere Variante, GXI*, konstruiert. In dieser wurde das verschobene Leseraster rekonstituiert (Abb. 3.27c). Hierfür sollte zunächst das deletierte Adenin an dritter Stelle des Codons für Glutamat 18 wieder eingefügt werden. Da dies aber aufgrund einer stillen Mutation (TAC → TAA) im Tyrosin 20 der Wildtyp-Sequenz in GXI* zu einem vorzeitigen Stopp-Codon geführt hätte, wurde die Nucleotidsequenz der Aminosäuren Valin 18, Alanin 19 und Lysin 20 nicht verändert und anstelle des Adenins ein Guanin in der Aminosäure Lysin 21 eingefügt. Dies führte zur Substitution K21E und folglich auch zur Wiederherstellung des Leserasters. Desweiteren wurde die zweite Leserasterverschiebung durch die Insertion des Adenins an zweiter Position im Code für die Aminosäure Aspartat 43 aufgehoben. Die Substitutionen E1D und T11S wurden beibehalten. Alle zwei Varianten, GXI und GXI*, des hochaffinen Binders sollten in einem unabhängigen System auf ihre Interaktion zu Rev untersucht werden (3.3.5.1 und 3.3.5.2).

3.3.5.1 Pull down-Assay zur Analyse der Rev-Interaktion in vitro

Für die *in vitro*-Analyse wurden die Varianten GXI (5 kDa) und GXI* (5 kDa) in das pGEX-KG Expressionsplasmid kloniert (6.2.2.1). Die GST-Fusionsproteine wurden in *E.coli* (6.3.1) exprimiert und über die Affinitätsmatrix Glutathion-Sepharose aufgereinigt (6.3.2.1). Alle Expressions- und Aufreinigungsschritte wurden, wie in 3.2.4 exemplarisch für GST-SamR2 abgebildet, in einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Daten nicht gezeigt). Desweiteren wurde die Expression aller aufgereinigten Fusionsproteine im Western Blot mit einem α -GST-spezifischen Antikörper (5.8) verifiziert. Neben den Volllänge-Proteinen waren auch hier teilweise Degradationsprodukte erkennbar (Abb. 3.29a).

Die Interaktion wurde *in vitro* mit dem Pull down-Assay verifiziert (6.3.6). Die aufgereinigten Proteine GST-Sam80, GST-SamR1 und GST-SamR2, sowie GST-GXI und GST-GXI* wurden an magnetischen *Beads* immobilisiert und durch Inkubation mit Zelllysat von 293T-Zellen, die mit einem Expressionsplasmid für Rev-Strep transfiziert worden waren (Abb. 3.29b, Spur 1), auf ihre Interaktion mit Rev untersucht. GST und GST-SamR1 zeigten als

Negativkontrollen keine Interaktion mit Rev-Strep (Abb. 3.29b, Spuren 2 und 4). GST-Sam80 und GST-SamR2 (Abb. 3.29b, Spuren 3 und 5) bestätigten, wie erwartet, die Bindung an Rev-Strep. Die Varianten des hochaffinen Binders, GST-GXI und GST-GXI*, wiesen eine im Vergleich zu GST-Sam80 und GST-SamR2 relativ schwache Bindung an Rev-Strep auf (Abb. 3.29b, Spuren 6 und 7).

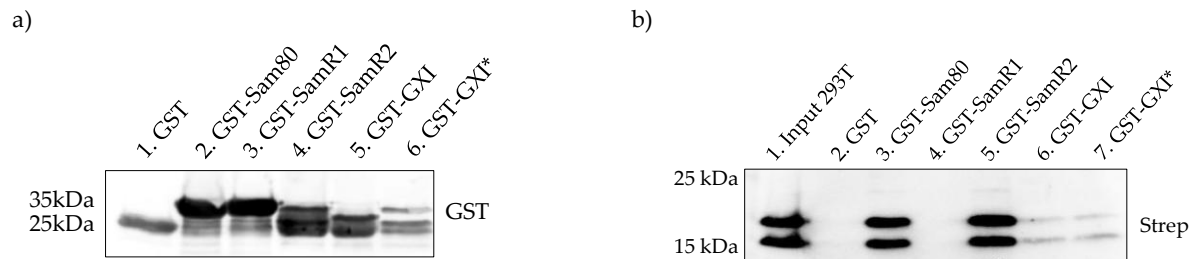


Abb. 3.29: Analyse der Rev-Interaktion mit GXI und GXI* *in vitro*.

a) Expressionsnachweis der aufgereinigten Proteine.

60 µg Gesamtprotein wurden pro Spur geladen und mit einem α-GST-Antikörper mittels einer Western Blot-Analyse detektiert.

b) Nachweis der *in vitro*-Interaktion zwischen Rev-Strep und den GST-fusionierten Peptiden von Sam68, sowie den Varianten GST-GXI bzw. -GXI* mittels Pull down-Assay und anschließender Western Blot-Analyse.

Die aufgereinigten Proteine (60 µg) wurden an magnetische Beads gebunden und mit 2.5 mg Zellysate aus mit pcRev-Strep transfizierten 293T-Zellen inkubiert. Dieses Zellysate aus 293T-Zellen diente auch als Kontrolle der Expression von Rev-Strep. Gebundenes Protein wurde in einer Western Blot-Analyse mit einem α-Strep-Antikörper (5.8) detektiert.

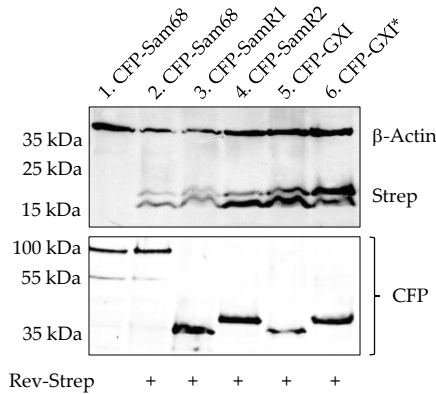
3.3.5.2 Co-Immunopräzipitation zur Analyse der Rev-Interaktion *in vivo*

Die Rev-Interaktion der Varianten GXI und GXI* sollte ebenfalls *in vivo* mit einer Co-Immunopräzipitation (6.3.7) untersucht werden. Hierfür wurden beide Proteine N-terminal an ein CFP-tag fusioniert (6.2.2.2). Die bereits untersuchten Fusionsproteine CFP-Sam68 und CFP-SamR2 (3.2.2) wurden als Positivkontrolle herangezogen. CFP-SamR1, welches keine Interaktion mit Rev gezeigt hatte (3.2.2), diente als zusätzliche Negativkontrolle. Alle genannten Konstrukte wurden mit Rev-Strep in 293T-Zellen co-transfiziert und nach 48 h die Expression in den hergestellten Zellysaten im Western Blot überprüft (Abb. 3.30a, Spuren 2-6). CFP-Sam68 wurde als Negativkontrolle ohne Rev-Strep transfiziert (Abb. 3.30a, Spur 1).

In Abbildung 3.30b ist die Analyse der Rev-Bindung von GXI und GXI* gezeigt. Wie erwartet interagierten CFP-Sam68 und CFP-SamR2 mit Rev-Strep (Abb. 3.30b, Spuren 3 und 5). Wurde CFP-Sam68 ohne Rev-Strep exprimiert, so blieb die Interaktion aus (Abb. 3.30b, Spur 2). Ebenfalls zeigte CFP-SamR1 keine Rev-Strep-Bindung (Abb. 3.30b, Spur 4). Weder CFP-GXI noch CFP-GXI* konnten die Rev-Strep-Interaktion *in vivo* bestätigen (Abb. 3.30b,

Spuren 6 und 7). Eine unspezifische Bindung oder Kreuzreaktion der Antikörper wurde mit den Kontrollen IgG und AK ausgeschlossen (Abb. 3.30b, Spuren 1 und 8).

a)



b)

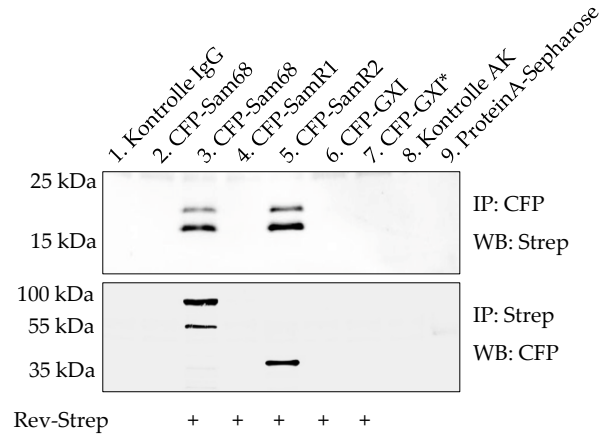


Abb. 3.30: Analyse der Rev-Interaktion mit GXI und GXI* *in vivo*.

a) Expressionsnachweis des exprimierten Rev-Strep, des CFP-Sam68 bzw. der Peptide CFP-SamR1 und CFP-SamR2, sowie der Varianten CFP-GXI und CFP-GXI* mittels Western Blot-Analyse.

293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für CFP-Sam68 und pcDNA3.1(+) (Spur 1) bzw. Rev-Strep (Spur 2), für die Peptide CFP-SamR1 bzw. CFP-SamR2 und Rev-Strep (Spuren 3-4) und für die Varianten CFP-GXI bzw. CFP-GXI* und Rev-Strep (Spuren 5-6) transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Expression wurde mit einem α -Strep-Antikörper für Rev-Strep und einem α -CFP-Antikörper für CFP-Sam68, CFP-SamR1 bzw. CFP-SamR2 oder CFP-GXI bzw. CFP-GXI* analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Actin.

b) Nachweis der *in vivo*-Interaktion zwischen Rev-Strep und CFP-Sam68, CFP-SamR1 oder CFP-SamR2 bzw. CFP-GXI oder CFP-GXI* mittels Co-Immunopräzipitation und anschliessender Western Blot-Analyse.

ProteinA-Sepharose-Beads wurden mit 2 μ g eines α -CFP-spezifischen oder α -Strep-spezifischen Antikörpers inkubiert und anschliessend mit Zellysaten (500 μ g) aus transfizierten 293T-Zellen versetzt. Gebundenes Rev-Strep bzw. CFP-Sam68, gebundene Peptide CFP-SamR1 oder CFP-SamR2 bzw. gebundene Varianten CFP-GXI oder CFP-GXI* wurden nach Co-Immunopräzipitation und anschliessender Western Blot-Analyse mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

4. Diskussion

Die Rev/Sam68-Interaktion sollte gezielt mit optimierten, transdominanten Rev/Sam68-Inhibitorpeptiden beeinflusst werden, um weitere Aufschlüsse über den RNA-Metabolismus bei HIV-1 und Ansätze für neue Therapiekonzepte mit zellulären Targets zu liefern. Hierfür wurden die Domänen beider Proteine, welche an dieser Interaktion beteiligt sind, identifiziert und charakterisiert. Ausgehend von der Kenntnis dieser Interaktionsdomänen wurde eine Sam68-Varianten-Bibliothek zur Selektion hochaffiner Kandidaten mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie generiert. Die Rev-Interaktion dieser höher affinen Sam68-Varianten wurde anschliessend in weiteren Systemen untersucht.

4.1 Identifizierung und Charakterisierung der Sam68-Bindestelle im Rev-Protein

4.1.1 Die Sam68-Bindestelle im Rev-Protein: ein strukturelles Motiv

Die Interaktion des Rev-Proteins mit Sam68 konnte in eigenen Vorarbeiten und in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden^{180,181,186}. Jedoch wurden bisher keine gezielten Analysen zur Identifikation der Sam68-Interaktionsstelle im Rev-Protein durchgeführt. Dies mag auf die komplexe Struktur des Rev-Proteins, dessen Tertiärstruktur erst kürzlich teilweise aufgelöst werden konnte, zurückzuführen sein^{101,109}. Da aber die Charakterisierung der Bindestelle für die Entwicklung eines transdominanten Inhibitors der Rev/Sam68-Interaktion unerlässlich war, wurden in dieser Arbeit gezielt wichtige Regionen im Rev-Protein zur Identifikation der Bindestelle deletiert. Basis für die Konstruktion der Rev-Mutanten waren unter anderem die Arbeiten von Thomas *et al.*, die 1998 essentielle Aminosäuren in den beiden Oligomerisierungsdomänen des Rev-Proteins mit Hilfe gerichteter Mutagenese charakterisierten⁸¹. Sie postulierten daraufhin, dass Rev mit seinen beiden Oligomerisierungsdomänen ein Helix-loop-Helix-Motiv, welches bereits 1994 von Auer *et al.* teilweise beschrieben worden war, ausbildet und dadurch eine intermolekulare, hydrophobe Oberfläche mit den exponierten Aminosäuren Leu22, Ile59 und Leu60 entsteht^{102,223}. Zugleich lieferte die Veröffentlichung von Jain und Belasco, die durch Analyse von oligomerisierungsdefizienten Rev-Mutanten ebenfalls essentielle Aminosäuren

charakterisierten und ein Modell zur Rev-Oligomerisierung vorstellten, einen wesentlichen Beitrag zur Konzeption der Rev-Mutanten ¹¹⁰. Dabei sind die aliphatischen Aminosäuren in den Regionen AS 12-22 (Leu12, Val16, Leu18, Ile19 und Leu22) und AS 52-60 (Ile52, Ile55, Ile59 und Leu60), die innerhalb der HIV-Subtypen konserviert sind, essentiell für eine molekulare Interaktion der Rev-Monomere. Die Mutation oder Deletion dieser Aminosäuren störte trotz intakter RRE-Bindung die Ausbildung höher geordneter Rev-Multimere. In Abbildung 4.1 sind die entstehenden Interaktionsflächen während der Ausbildung des Helix-loop-Helix-Motivs dargestellt. Dabei sind vor allem die Aminosäuren Leu18 und Ile55 (Abb. 4.1, grün markiert) essentiell für die intermolekulare Interaktionsfläche A, die Aminosäuren Leu12, Val16 und Leu60 (Abb. 4.1, blau markiert) sind wichtig für die Ausbildung der intermolekularen Interaktionsfläche B. Beide Flächen sind Voraussetzung für die Bindung weiterer Rev-Moleküle ^{109,110}. Die Aminosäuren Ile19, Leu22, Ile52 und Ile59 (Abb. 4.1, rot markiert) verbinden und stabilisieren die beiden Helices durch eine intramolekulare Interaktionsfläche.

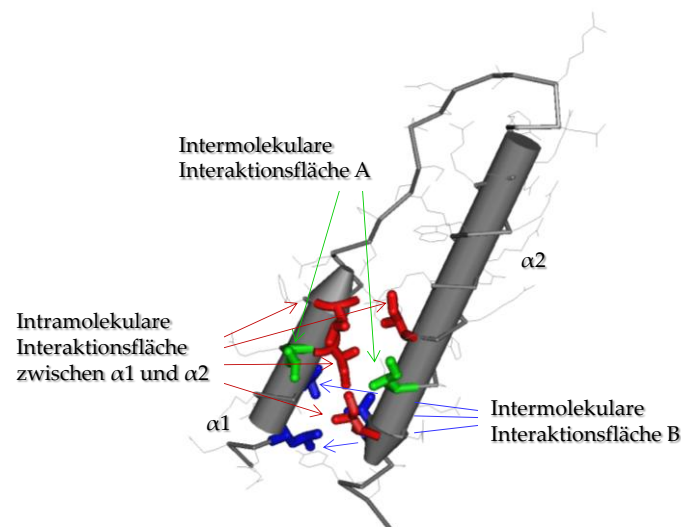


Fig. 4.1: Modell eines Rev-Monomers mit den hydrophoben Interaktionsflächen der Helix-loop-Helix Anordnung (verändert nach ^{109,110}).

Die Helix $\alpha 1$ wird aus der ersten Oligomerisierungsdomäne gebildet und mündet in die *loop*-Region. Die zweite Helix $\alpha 2$ entsteht aus der zweiten Oligomerisierungsdomäne und beinhaltet ausserdem den RRE-Bindebereich. Die rot markierten Aminosäuren tragen zur Stabilisierung der beiden Helices bei und bilden dabei eine intramolekulare Interaktionsfläche aus. Grün markierte Aminosäuren sind essentiell für die Ausbildung einer intermolekularen Interaktionsfläche A für die Bindung eines weiteren Rev-Monomers. Die zweite intermolekulare Interaktionsfläche B befindet sich auf der Gegenseite und wird aus den blau markierten Aminosäuren gebildet.

Die in dieser Arbeit auf die Sam68-Interaktion untersuchten Mutanten Rev Δ 1-34, Rev Δ 18-24, Rev Δ 54-60 und Rev Δ Double (3.1.1) besitzen Deletionen essentieller Aminosäuren in den beschriebenen Interaktionsflächen, die für die Oligomerisierung wichtig sind. Sie werden

auch als N-terminale Mutanten bezeichnet, da die Deletionen den N-Terminus (AS 1-63) des Rev-Proteins abdecken. Diese lassen sich in zwei Klassen einteilen²¹³. Entweder zeichnen sie sich durch eine gestörte Oligomerisierung aus, wobei aber der RRE-Bindebereich intakt ist, oder sie besitzen Deletionen im RRE-Bindebereich und dadurch auch im Kernlokalisierungssignal. Erstere führen zu einer Absonderung der viralen RRE-RNA Spezies und zur Hemmung der Rev-Exportfunktion⁸¹. Letztere inhibieren aufgrund ihrer cytoplasmatischen Lokalisation durch Oligomerisierung mit dem Wildtyp Rev seine Akkumulation im Zellkern und somit den Export der viralen RNA^{224,225}. Während Sam68 mit Rev Δ 1-34, Rev Δ 18-24 bzw. Rev Δ 54-60 noch in der Lage war sowohl *in vivo* (3.1.2, Abb. 3.2) als auch *in vitro* (3.1.3, Abb. 3.4) mit Sam68 zu interagieren, zeigte die Mutante Rev Δ Double in beiden Fällen (3.1.2, Abb. 3.2; 3.1.3, Abb.3.4) keine Bindung an Sam68. Ob der C-Terminus des Rev-Proteins eine Rolle in der Sam68-Interaktion spielt, sollte mit einer C-terminalen Deletionsmutante, Rev Δ 64-116, untersucht werden. Die Funktion des C-Terminus besteht hauptsächlich in der Bindung des Rev-Proteins über seine Kernexportsequenz an die zelluläre Exportmaschinerie CRM-1²²⁶. Dennoch scheint dieser teils konservierte Bereich des Proteins auch einen Einfluss auf die Oligomerisierung auszuüben. Mutanten mit Defekten in der C-terminalen Region und einer schwachen Affinität zu CRM-1 zeigten eine reduzierte Fähigkeit zu oligomerisieren⁸⁶. Desweiteren scheinen zelluläre Cofaktoren *in vivo* die Multimerisierung zu begünstigen⁸⁶. Die Analyse der Sam68-Interaktion *in vivo* (3.1.2, Abb. 3.2) und *in vitro* (3.1.3, Abb. 3.4) zeigte, dass auch diese C-terminale Region in die Rev-Bindung involviert ist. Der Sam68-Bindebereich besteht somit aus einem strukturellen Motiv, welches aus den Regionen AS 18-24, AS 54-60 und AS 64-116 gebildet wird (Abb. 4.2) (1.2.2). Möglicherweise ist Sam68 ein zellulärer Cofaktor des Rev-Proteins, welcher unter anderem die Ausbildung eines höher geordneten Rev-Multimers unterstützt, indem es an die Rev-Monomere bindet und dadurch deren hydrophobe Bereiche als eine Art Chaperon abdeckt. Somit würde Sam68 Rev vor Degradation oder Interaktion mit schädlichen Proteinen schützen bevor die Rev-Monomere den RRE-Komplex ausbilden. Die fehlende Sam68-Interaktion in der Mutante Rev Δ 64-116 würde - trotz der kontroversen Datenlage - auch für eine Beteiligung von Sam68 am CRM-1 abhängigen Export des Rev-RRE-Komplexes sprechen, da die Interaktionsstellen von Sam68 und CRM-1 in der Region AS 64-116 liegen^{181,183}.

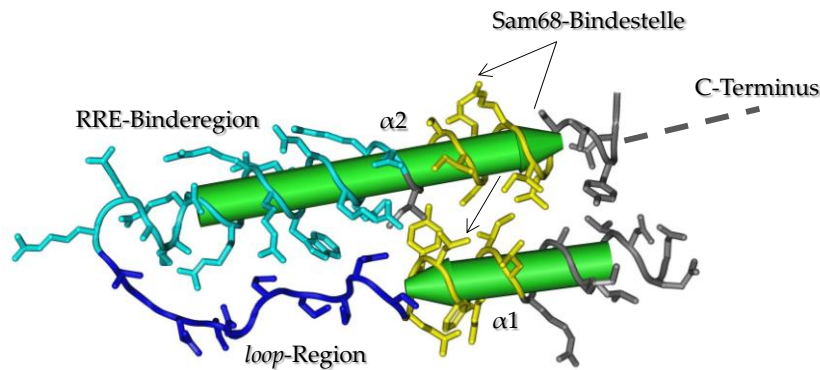


Fig. 4.2: Ribbon-Darstellung eines Rev-Monomers als Helix-loop-Helix-Motiv mit koplanaren Helices (verändert nach ¹⁰¹).

Die N-terminale Region (AS 1-64) wird als eine Helix-loop-Helix-Struktur (helikale Schleife) aus den beiden Oligomerisierungsdomänen und der dazwischen liegenden RRE-Bindestelle angeordnet. Ein Strang dieser Schleife besteht aus einer α -Helix ($\alpha 1$, grün), gefolgt von der loop-Region (dunkelblau). Der zweite Strang wird aus einer etwas längeren α -Helix ($\alpha 2$, grün) und der RRE-Binderegion (hellblau) gebildet. Die α -Helices dieser Schleife bilden eine planare Struktur aus. Unpolare Aminosäurereste gruppieren sich um die anliegenden Oberflächen der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Helix und bilden einen hydrophoben Kern aus, der mindestens zwei Aufgaben erfüllen könnte: a) Stabilisierung dieser helikalen Schleife und b) Exposition hydrophober Oligomerisierungsoberflächen ¹⁰¹. Für die Sam68-Interaktion essentielle Aminosäuren wurden gelb hervorgehoben. Der C-Terminus des Rev-Proteins, dessen Kristallstruktur bisher nicht aufgelöst werden konnte, ist in gestrichelten Linien dargestellt.

4.1.2 Gestörte Oligomerisierung der Rev-Deletionsmutanten an RRE-haltiger RNA

Mit Hilfe der FRET-Analyse konnte gezeigt werden, dass Rev fähig ist in Gegenwart einer RRE-RNA zu oligomerisieren (3.1.4.1). Basierend auf diesem Ergebnis sollte eine eventuell gestörte Oligomerisierung aufgrund defekter Oligomerisierungsoberflächen in den erstellten Rev-Mutanten in einem negativen FRET-Effekt resultieren. Diese Analyse gibt natürlich nur Aufschluss darüber, ob die Mutanten oligomerisieren oder nicht. Alle N-terminalen Rev-Mutanten (3.1.4.1: Abb. 3.6; Rev Δ 1-34, Rev Δ 18-24, Rev Δ 54-60 und Rev Δ Double) zeigten keine Oligomerisierung. Bereits in früheren Studien konnte bestätigt werden, dass eine gestörte Oligomerisierung unter anderem auf Mutationen in den Oligomerisierungsdomänen mit einem intakten RRE-Bindemotiv zurückzuführen ist. So zeigte beispielsweise eine Mutation der Aminosäuren Leu18 und Tyr23 eine defekte Multimerisierung. Es wurde daraufhin postuliert, dass Deletionen in diesen Regionen mit einer Destabilisierung der tertiären Struktur des Proteins einhergehen ^{214,227,228}. Jeong *et al.* hatten zwar für die Mutante Rev Δ 18-24 eine intakte Oligomerbildung beobachtet, dies konnte aber in der FRET-Analyse nicht bestätigt werden ²¹³. Untersuchungen von Madore *et al.* an verschiedenen oligomerisierungsdefizienten Rev-Mutanten führten zu der Beobachtung, dass es in den Multimerisierungsstudien oft Diskrepanzen gibt, je nach Methode und auch ob diese *in vitro*

oder *in vivo* durchgeführt wurde ⁸⁶. Die fehlende Oligomerisierung in Rev Δ 54-60 deckt sich mit dem Ergebnis einer von Jeong *et al.* untersuchten Mutante, bei der die Aminosäuren AS 51-60 deletiert worden sind ²¹³. Sie zeigte eine verminderte Oligomerisierung. Wie bereits in 4.1.1 erwähnt, führten Defekte in der C-terminalen Region zu einer Schwächung der Affinität zu CRM-1 und einer reduzierten Fähigkeit zu oligomerisieren ⁸⁶. Dies würde die fehlende Oligomerisierung der Rev Δ 64-116 Mutante (3.1.4.1, Abb. 3.6) erklären. Trotzdem würde ein EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)-Assay, bei dem das Potential aufgereinigter Rev-Mutanten an einer z.B. radioaktiv markierten RRE-RNA zu multimerisieren untersucht werden kann, genauere Aussagen liefern. Je nach der Größe des Oligomers würden Monomere, Dimere, Trimere usw. sichtbar gemacht werden. Ebenfalls würden hier Unterschiede in der Oligomerbildung der einzelnen Mutanten verdeutlicht.

4.1.3 Einfluss der Rev-Deletionsmutanten auf den Export RRE-haltiger RNA

Die Funktionalität der Rev-Mutanten wurde in einem subgenomischen Reportersystem mit einem Rev-abhängigen Reporterkonstrukt untersucht (3.1.4.2). Im Vergleich zum Wildtypprotein Rev zeigten alle Rev-Deletionsmutanten eine verminderte GFP-Expression, was auf einen gestörten Export des Reporterkonstrukts zurückzuführen sein dürfte (3.1.4.2, Abb. 3.7). Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da die deletierten Bereiche überwiegend in den Oligomerisierungsdomänen liegen. Intakte Oligomerisierungsoberflächen im Rev-Protein sind weiterhin Voraussetzung für die Ausbildung der komplexen Struktur des Proteins, eines höher geordneten Oligomers an der RRE-RNA, und folglich für die Rev-Funktion ^{76,86,109}. Ebenso war die Aktivität der Rev Δ 64-116-Mutante stark vermindert. Wie bereits in 4.1.1. und 4.1.2 erwähnt, ist der C-terminale Bereich (64-116) des Proteins für den Export der viralen RNA verantwortlich. Zudem scheint er auch auf die Multimerisierung Einfluss zu nehmen. Durch die Deletion wurden vermutlich beide Funktionen des Proteins gehemmt. Interessanterweise führte eine Überexpression von Sam68 in Anwesenheit von Rev zu einem Rückgang der GFP-Expression. Da die Sam68-Interaktionsstelle in Rev teils in den Oligomerisierungsflächen liegt, könnten das überexprimierte Sam68 und weitere Rev-Moleküle um diese Bindestellen und dadurch um den Export der RNA aufgrund von sterischen Einflüssen konkurrieren. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der RevM10-Mutante in Co-Expression mit Sam68 um die Bindung an RRE-RNA diskutiert ¹⁸¹. Eine Überexpression von Sam68 konnte den gestörten

Export der funktionell defekten Rev-Mutanten partiell wiederherstellen. Dies würde mit den von Reddy *et al.* publizierten Daten im Einklang stehen, dass Sam68 partiell die Rev-Funktion ersetzen kann¹⁸¹. Interessanterweise konnte Sam68 auch in Anwesenheit der Rev-Mutanten, bei denen eine Region der zusammengesetzten Sam68-Bindestelle (Double oder AS 64-116) deletiert war, die GFP-Expression steigern. Entweder ist hier eine Region ausreichend für eine minimale Bindung von Sam68 an Rev, oder Sam68 kann direkt an die RRE-RNA binden, wie es bereits kontrovers diskutiert wurde^{181,185}.

4.1.4 Einfluss der Rev-Deletionsmutanten auf die HIV-Replikation

Rev-Mutanten, die oligomerisierungsdefizient und somit nicht funktionsfähig sind, könnten die Funktion des Wildtypproteins Rev blocken. Dieser transdominant negative Phänotyp würde als kompetitiver Inhibitor den Wildtyp hemmen und dadurch die RRE-haltige, virale RNA sequestrieren⁸¹. Die Coexpression der Rev-Mutanten mit proviraler DNA pNL4-3 wies aber keine transdominante Inhibition der HIV-1-Replikation auf (3.1.4.3, Abb. 3.8). Trikha *et al.* hatten jedoch auch bei Rev-Mutanten mit Deletionen oder Mutationen in den Oligomerisierungsflächen keinen transdominant negativen Phänotyp im Hinblick auf die Rev-Funktion beobachten können²²⁹. Die Deletion der C-terminalen Region in der Mutante Rev Δ 64-116 zeigte keinen transdominant negativen Phänotyp, obwohl hier wichtige Aminosäuren wie bei der RevM10-Mutante deletiert sind. Diese akkumuliert aufgrund der Substitution der Aminosäuren LG zu DL an Position 78/79 in der Kernexportsequenz mit dem Wildtyp im Zellkern und kann die RRE-RNA nicht mehr ins Cytoplasma transportieren^{80,81,86}. Malim *et al.* hatten auch bei einer Mutante mit Deletion des gesamten C-Terminus keinen stark ausgeprägten transdominant negativen Phänotyp beobachten können und argumentierten, dass durch diese Deletion vermutlich auch Bereiche, die in die Bindung an zelluläre Cofaktoren wie z.B. CRM-1 involviert sind (4.1.1), beeinträchtigt seien⁸⁰. Dies würde den beobachteten Phänotyp der Rev Δ 64-116-Mutante erklären.

4.1.5 Verändertes Lokalisationsmuster der Rev-Deletionsmutanten

Kalland *et al.* hatten Analysen zur zellulären Distribution des Rev-Proteins in verschiedenen Zelllinien durchgeführt²³⁰. Dabei fanden sie eine sehr komplexe Verteilung des Proteins in einzelnen Zellen. Entweder war Rev im Cytoplasma, in einer perinucleären Zone, diffus im Zellkern und/oder in den Nucleoli lokalisiert. Im Zellkern zeigte Rev oft eine fleckenartige

Colokalisation mit zellulären Wirtsfaktoren, die dafür bekannt sind, mit entstehenden Transkripten zu assemblieren und heterogene RNA zu prozessieren. Desweiteren wurde eine Kombination der verschiedenen Lokalisationsmuster beobachtet. Die Verteilung von CFP-Rev in 293T-Zellen bestätigte diese Beobachtungen (3.1.5, Abb. 3.9). Viele Gruppen hatten bei Rev-Mutanten mit Deletionen oder Mutationen in den Multimerisierungsflächen ein im Vergleich zum Wildtyp Rev verändertes Lokalisationsmuster beobachten können^{228,229,231}. Dies stimmt überein mit den untersuchten N-terminalen Rev-Mutanten (Rev Δ 1-34, Rev Δ 18-24, Rev Δ 54-60 und Rev Δ Double), die eine veränderte Lokalisation zeigten (3.1.5, Abb. 3.9). Die Deletion der Kernexportsequenz in Rev Δ 64-116 hatte wie erwartet eine Retention in bestimmten Subkompartimenten im Zellkern zur Folge (3.1.5, Abb. 3.9).

4.2 Identifizierung und Charakterisierung der Rev-Bindestelle im Sam68-Protein

4.2.1 Die Rev-Bindestelle im Sam68-Protein: ein linearer Bereich

Zwei Gruppen hatten in der Vergangenheit versucht die Rev-Interaktionsstelle in Sam68 auf eine definierte Region einzugrenzen. Einerseits sollte nach *in vitro*-Analysen die Region 1-329 an der Rev-Bindung verantwortlich sein, andererseits zeigten *in vivo*-Analysen, dass die Aminosäuren 321-410 im C-Terminus des Proteins Rev binden^{181,186}. Fügt man diese Erkenntnisse zusammen, so schien der Bereich 321-410 zur Charakterisierung der Rev-Bindestelle und insbesondere der nur 9 Aminosäuren lange überlappende Bereich interessant zu sein. Weder die Sam68 Δ 321-410 Mutante, noch Sam68 Δ 321-443 zeigten *in vivo* eine Interaktion mit Rev (3.2.2, Abb. 3.11). Im Gegensatz zu den Daten von Reddy *et al.* war auch die Mutante Sam68 Δ 330-443 nicht fähig Rev zu binden (3.2.2, Abb. 3.11)¹⁸¹. Da die Deletion der Aminosäuren 321-330 in Sam68 eine Rev-Bindung nicht verhinderte, wurden in den nächsten Interaktionsanalysen die Bereiche 330-410 und 410-443 näher untersucht. Letztendlich war die Region 330-410 in die Rev-Interaktion involviert (3.2.2, Abb. 3.11). Eine Auftrennung dieses Bereichs in zwei Teilbereiche (R1: AS 330-368 und R2: AS 364-410) schränkte den Rev-Bindebereich *in vivo* und *in vitro* auf die Region R2 ein (3.2.2, Abb. 3.12; 3.2.3, Abb. 3.13; 3.2.4, Abb. 3.15). Die Region 364-410 ist ein Tyrosin-reicher Bereich im C-Terminus von Sam68 (3.2.1, Abb. 3.10). Wie bereits in 1.4.1 und 1.4.2 erwähnt, wird Sam68 an seinen Tyrosin-Resten durch bestimmte Kinasen phosphoryliert, was essentiell für seine

Funktion als mögliches Adapterprotein im Zellmetabolismus ist. Des Weiteren werden durch diese posttranslationale Modifikation die RNA-Bindeeigenschaften von Sam68 verändert¹⁵³. Diese Erkenntnisse deuten daraufhin, dass die Rev-Interaktionsregion R2 (AS 364-410) von Sam68, ein linearer Bereich, einen wesentlichen Beitrag entweder direkt durch Rev-Sam68-Interaktion oder indirekt über Veränderung der RNA-Bindeeigenschaften von Sam68 zum Rev-abhängigen RNA-Metabolismus beiträgt.

4.2.2 Sam68 – Synergie mit Rev

Im Bezug auf die Funktion von Sam68 und Rev reflektieren zahlreiche Variationen die Unterschiede im Gebrauch von verschiedenen Zelllinien, Reporterkonstrukten und/oder Assay-Bedingungen. Einige Untersuchungen mit Reporterkonstrukten oder proviraler DNA zeigten, dass Sam68 mit Rev synergistisch wirkt und die Reporterexpression steigert^{181,185}. Dieser Effekt konnte mit dem UTR-wtgag-RRE-Reporterkonstrukt in 293T-Zellen nicht beobachtet werden (3.2.5.1, Abb. 3.16). Vielmehr schien die Überexpression von Sam68 einen negativen Einfluss auf die Gag-Expression zu haben. Die gleiche Tendenz wurde im UTR-hivGFP-RRE-Reportersystem beobachtet (3.1.4.2, Abb. 3.7) und in 4.1.3 bereits diskutiert. Im Gegensatz dazu resultierte aber eine Überexpression von Sam68 im proviralen Kontext in einer unerwartet hohen Steigerung der Gag-Expression (3.2.5.2, Abb. 3.17). Gleichzeitig führte die Sam68-Überexpression in einem weiteren Provirus-Replikationsassay zu einer im Vergleich dazu geringeren Zunahme der Gag-Expression (3.2.5.3, Abb. 3.18). Zudem zeigte der Ansatz mit Provirus ohne überexprimiertes Sam68 in beiden Replikationsanalysen erhebliche Schwankungen in der Gag-Expression trotz gleich eingesetzter proviraler DNA-Mengen. Ein systematischer Vergleich verschiedener Provirus- und Sam68-Verhältnisse, sowie der eingesetzten DNA-Mengen könnte eventuell weiteren Aufschluss über diese Variation im Bezug auf einen synergistischen Effekt von Sam68 auf die HIV-1-Replikation geben.

4.2.3 Einfluss der Sam68-Deletionsmutanten auf den Export und die HIV-Replikation

Reddy *et al.* und weitere Gruppen hatten einen transdominant negativen Phänotyp auf den Export viraler RNA und die HIV-Replikation beobachtet, wenn die Kernlokalisationssequenz am C-Terminus von Sam68 deletiert oder mutiert ist^{181,182,188,191,192,232}. Aus diesem Grund wurden die Mutanten Sam68 Δ 330-443 und Sam68 Δ 410-

443 zur Analyse des Einflusses von Sam68 auf die Exportfähigkeit und die Replikation herangezogen. Wie bereits in der Einleitung (1.4.2) erwähnt, gibt es unterschiedliche Meinungen dazu, wie diese transdominanten Sam68-Mutanten ihren negativen Einfluss ausüben. Sicher ist, dass sowohl der quasi-lentivirale Reporter (3.2.5.1, Abb. 3.16), als auch die HI-virale Replikation (3.2.5.2, Abb. 3.17 und 3.2.5.3, Abb. 3.18) durch Sam68 Δ 330-443 bzw. Sam68 Δ 410-443 weitgehend gehemmt wurden.

Desweiteren wurde eine Region (AS 269-321) in Sam68 beschrieben, deren Präsenz essentiell für den inhibitorischen Effekt der transdominant negativen Sam68-Mutanten ist ¹⁹². Marsh *et al.* postulierten, dass auch weitere Regionen im N-Terminus einen ähnlichen Einfluss haben ¹⁹¹. Dieser Effekt konnte ebenfalls sowohl im Reportersystem (3.2.5.1, Abb. 3.16), als auch im proviralen Kontext (3.2.5.2, Abb. 3.17) für die Mutante Sam68 Δ 321-443 beobachtet werden. Der transdominant negative Phänotyp von Sam68 Δ 330-443 und die Hemmung dieses Phänotyps bei Sam68 Δ 321-443 lässt darauf schliessen, dass die Region AS 321-330 für den inhibitorischen Einfluss der transdominanten Mutante verantwortlich ist.

Die Mutanten Sam68 Δ 321-330, Sam68 Δ 321-410 und Sam68 Δ 330-410, alle mit einer intakten Kernlokalisationssequenz und RNA-Bindedomäne, zeigten im Reportersystem keinen ausgeprägten Einfluss auf den Export (3.2.5.1, Abb. 3.16). Im Replikationsassay war die Gag-Expression im Vergleich zur Überexpression von Sam68 deutlich reduziert, jedoch nicht so stark wie bei den transdominant negativen Mutanten (3.2.5.2, Abb. 3.17).

Die Deletion der Rev-Binderegion in den Mutanten Sam68 Δ 321-410, Sam68 Δ 321-443 und Sam68 Δ 330-410 führte im Reportersystem und HIV-Replikationsassay weder zu einer ausgeprägten Störung des Exports noch der Virusreplikation. Es bleibt zu berücksichtigen, dass möglicherweise auch das endogen exprimierte Sam68 eine wesentliche Rolle in diesen Systemen spielt. Eine Zelllinie, in der die Sam68-Expression unterbunden wird, könnte möglicherweise detailliertere Erkenntnisse über den Einfluss der untersuchten Mutanten auf den Export bzw. die virale Replikation liefern. Eine vollständige Hemmung der endogenen Sam68-Expression konnte allerdings bisher durch RNA-Interferenz nicht erreicht werden. Modem *et al.* konnten die endogene Expression von Sam68 nur auf 10-30% reduzieren ¹⁸⁷. Daher wäre die Generierung einer Sam68-*Knockout*-Zelllinie (z.B. mit Hilfe von Zinkfinger-Nucleasen) in diesem Kontext wünschenswert.

4.2.4 Gehemmte Wiederherstellung der Rev-Funktion durch Deletion Rev-Interaktionsstelle in Sam68

Li *et al.* und Modem *et al.* konnten zeigen, dass eine Herunterregulierung der Sam68-Expression mit Hilfe von RNA-Interferenz zu einer Hemmung der Rev-abhängigen Genexpression führte und diese durch Coexpression von Rev nicht komplementiert werden konnte^{183,187}. Somit sei die Sam68-Expression wichtig für die Rev-Funktion¹⁸³. Deswegen wurde ein Kompetitionsassay durchgeführt, um den Einfluss von Sam68 mit einer deletierten Rev-Bindestelle und die Funktionalität der Mutanten im proviralen Kontext zu analysieren. Hierfür wurde die HIV-Partikelproduktion mit der transdominant negativen Mutante Sam68 Δ 330-443 runterreguliert (3.2.5.3, Abb. 3.18). Sam68 Δ C verursacht eine perinucleäre Anhäufung ungespleißter, viraler Transkripte und hemmt die Translation dieser RNA-Spezies, welche Rev-abhängig aus dem Zellkern exportiert wurden¹⁸⁸. Marsh *et al.* erklären den Sam68 Δ C-Effekt durch eine gehemmte Bindung der viralen RNA an PABP1, die in einer Veränderung der Interaktion mit zellulären Wirtsfaktoren resultiert, welche ebenfalls am viralen RNA-Export beteiligt sind¹⁹¹. Die Überexpression von Sam68 und Sam68 Δ 321-330 ergab, dass diese fähig sind den transdominant negativen Effekt auf die HIV-Replikation teilweise zu revertieren. Die Expression von Sam68 und Interaktion mit Rev ist in diesem Kontext offensichtlich wichtig für die Funktion von Sam68 auf die HIV-Replikation (3.2.5.2, Abb. 3.18). Gleichzeitig konnten keine der Mutanten mit einer deletierten Rev-Interaktionsstelle die Virusproduktion wiederherstellen (3.2.5.2, Abb. 3.18). Diese Erkenntnisse würden die Notwendigkeit einer direkten Interaktion von Sam68 und Rev während der HIV-Replikation stützen.

4.2.5 Subzelluläre Lokalisation der Sam68-Deletionsmutanten

Wie bereits in vielen Studien gezeigt, führte die Deletion des Kernlokalisierungssignals bei Sam68 Δ 330-443, Sam68 Δ 321-443 und Sam68 Δ 410-443 zu einem Ausschluss dieser Mutanten aus dem Zellkern (3.2.6, Abb. 3.19)^{181,192}. Das Lokalisationsmuster der Mutanten Sam68 Δ 321-330, Sam68 Δ 321-410 und Sam68 Δ 330-410 ähnelte dem des Wildtyp Sam68 (3.2.6, Abb. 3.19), welches, im Gegensatz zum *shuttle*-Protein Rev (3.1.5, Abb. 3.9), ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist¹⁷⁰. Eine Akkumulation dieser Proteine in sog. *Sam68 nuclear bodies* (SNBs) im Zellkern (1.4.1), wie sie in anderen Tumorzelllinien beobachtet wurde, war in den 293T-Zellen nicht sichtbar¹⁷¹. Aufgrund ihres geringen Molekulargewichts war eine freie Diffusion

von Sam80, SamR1 und SamR2 durch Kernporen möglich und resultierte in einer Lokalisation im Zellkern und Cytoplasma (3.2.6, Abb. 3.19).

4.3 Gerichtete Evolution hochaffiner Sam68-Liganden

4.3.1 Polyvalentes vs. monovalentes Display

Das Bio-Panning zur Selektion hochaffiner Sam68-Liganden sollte mit einem polyvalenten und monovalenten Display-System durchgeführt werden (1.5.2). Aufgrund der suboptimalen Diversität der Bibliothek im polyvalenten Display (3.3.2), wurde auf dieses Bio-Panning verzichtet. Das Genprodukt bestimmter Sequenzen kann für die *E.coli*-Zellen toxisch sein, so dass die Expression dieser Proteine durch vorzeitige Stopp-Codons verhindert wird (3.3.2). Desweiteren wurde der Wildtyp SamR2 (Positivkontrolle im polyvalenten Display) vermutlich nicht korrekt auf der Phagenoberfläche abgebildet, was in einem negativen Signal im Phagen-ELISA resultierte (3.3.2). Dies könnte eventuell auf die Größe des SamR2-Peptids (47 Aminosäuren) zurückzuführen sein. Normalerweise können nur kurze Peptidsequenzen mit 6-8 Aminosäuren auf jeder Kopie des p8-Proteins präsentiert werden ¹⁹⁵. Größere Peptide verhindern oft die korrekte Verpackung der Phagenpartikel, vermutlich aufgrund der Größenbeschränkung der durch das Protein p4 gebildeten Pore (1.5.1), die der Phage während der Assemblierung passiert ¹⁹⁵.

Das p3-Protein im monovalenten Display toleriert die Insertion größerer Peptide ¹⁹⁵. Desweiteren erfolgt in diesem Display-Verfahren die Selektion aufgrund reiner Affinität, wohingegen im polyvalenten Display die Avidität aufgrund höherer Kopienzahl des Proteins auf der Oberfläche mit mäßiger Bindungsaffinität im Vordergrund steht (1.5.2) ^{195,209,210}. Die Anreicherung im monovalenten Display erfolgte parallel mit zwei unterschiedlichen Helferphagen (1.5.2).

Mit M13K07 wurde auf der Phagenoberfläche aufgrund zweier Kopien des p3-Gens nicht nur das SamR2 in Fusion mit p3 abgebildet, sondern auch p3 ohne Fusion. In diesem System konnte keine Anreicherung von hochaffinen Bindern erreicht werden, vermutlich aufgrund der suboptimalen Präsentation hochaffiner Varianten auf der Phagenoberfläche (3.3.3.1, Abb. 3.23). Da das p3 ohne Fusion während der Assemblierung bevorzugt wird, dominierte möglicherweise p3 über SamR2-p3. Somit würde nur ein geringer Prozentsatz der Phagenpartikel das Zielprotein auf der Oberfläche tragen ²⁰⁸. Die Veröffentlichung von

Rondot *et al.* zeigte für den Helferphagen M13K07 eine mäßige Anreicherung positiver Klone im Vergleich zu dem Hyperphagen-System ²³³. Desweiteren wurde beim Vergleich der Phagentiter der von GST-Rev bzw. GST-gebundenen *Beads* eluierten Phagen (3.3.3.1, Abb. 3.23) eine Anreicherung unspezifischer Binder ab der Panningrunde PV beobachtet, was eventuell auf eine Überselektion zurückzuführen ist, bei der Klone mit unerwarteten Eigenschaften dominieren ¹⁹⁵.

Der Hyperphage zeichnet sich durch eine Deletion des *p3*-Gens im Genom des Helferphagen aus. Die Produktion des Hyperphagen erfolgte in einer eigens dafür etablierten *E.coli*-Verpackungszelllinie, in der das *p3*-Gen stabil genomisch vorliegt ^{208,233}. In diesem System wurde die SamR2-Bibliothek nur in Fusion mit *p3* in fünf Kopien pro Partikel auf der Phagenoberfläche abgebildet (1.5.2). Bereits Rondot *et al.* konnten mit diesem System eine Anreicherung positiver Klone (> 50 %) mit einer stärkeren Bindungsaffinität im Vergleich zum M13K07-Helferphagen (< 3 %) erreichen ²³³. So resultierte auch die Selektion nach fünf Panningrunden in einer Anreicherung hochaffiner Binder im Phagenüberstand (3.3.3.2). Vermutlich verbessert die erhöhte Anzahl der randomisierten SamR2-Peptide pro Phage, die auf der Oberfläche abgebildet werden, die Selektion in diesem System ²³³. Ein Fortsetzen der Selektion führte vermutlich zu einer Überselektion in der sechsten Panningrunde (3.3.3.2, Abb. 3.24), da die Bindungsaffinität rückläufig war und ein Vergleich der Phagentiter der von GST-Rev bzw. GST-gebundenen *Beads* eluierten Phagen auf eine Anreicherung unspezifischer Binder schliessen ließ. Das Vermeiden einer Überselektion ist neben der Qualität der Bibliothek und der korrekten Expression der abzubildenden Peptide ein sehr wichtiger Faktor während eines Bio-Pannings. Oft kann eine anscheinend erfolgreiche Selektion Klone mit unerwarteten Strukturen und Eigenschaften (Duplikationen in der Sequenz, schwache Affinität) hervorbringen, die auf eine Überselektion zurückgeführt werden können ¹⁹⁵. Ab dem Zeitpunkt, zu dem höher affine Binder den Phagenpool dominieren, ist ein weiterer Selektionsdruck bezüglich der Bindeaffinität ineffektiv. Andere Faktoren wie Expressionslevel oder Valenz beeinflussen daher die Selektion ¹⁹⁵.

4.3.2 Charakterisierung des Klons GXI

Im Bio-Panning konnte der Klon GXI selektioniert werden, welcher im Vergleich zum Wildtyp SamR2 im Phagen-ELISA (3.3.4, Abb. 3.26) eine höhere Bindungsaffinität zu Rev aufwies. Die Analyse der Sequenz ergab, dass GXI aufgrund eines vorzeitigen Stopp-Codons

durch eine Leserasterverschiebung bedingt durch eine 2-fache Basendeletion kein p3 exprimieren dürfte (3.3.5, Abb. 3.27). Das p3-Protein (Abb. 4.4), an welches die SamR2-Bibliothek N-terminal fusioniert wurde, spielt aber eine wichtige Rolle während des Phagen-Zyklus (1.5.1). Es leitet die Infektion der Zielzellen ein, indem seine N2-Domäne an den F-Pilus bindet²⁰¹. Dadurch bedingt erfolgt eine Konformationsänderung zwischen N1 und N2, so dass N1 an den Rezeptor TolA bindet, der den Eintritt des Phagen ins Periplasma der *E.coli*-Zelle ermöglicht^{203,234}. Desweiteren ist sein C-Terminus an der Termination der Phagenassemblierung beteiligt, indem der p3-p6-Komplex (1.5.1) am N-terminalen Ende des Partikels inkorporiert wird, bevor der Phagenpartikel beginnt sich von der Membran der *E.coli*-Zellen abzulösen^{195,199}. Ausserdem stabilisiert p3 die Bildung des Partikels. Man nimmt an, dass mindestens ein p3-Protein für die Assemblierung eines infektiösen Partikels²³⁵.

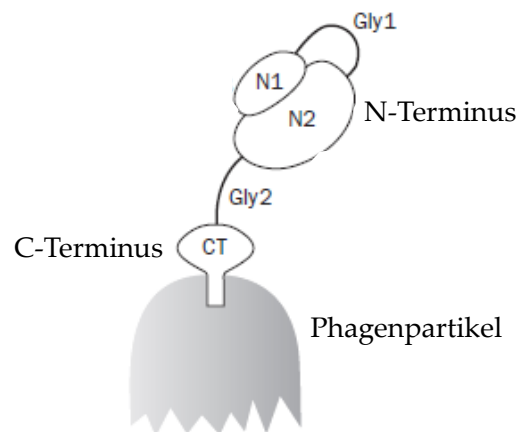


Abb. 4.4: Domänenstruktur des p3-Proteins (verändert nach¹⁹⁵).

Es sind drei Domänen des p3-Proteins vom N- bis zum C-Terminus gezeigt: N1, N2 und CT (C-terminal), die durch Glycin-reiche *linker*-Regionen (Gly1 und Gly2) verbunden sind. Die C-terminale Domäne, welche für die Partikelassemblierung verantwortlich ist, ist im Phagenpartikel verankert. Der N-Terminus (N1 und N2) leitet die Infektion der *E.coli*-Zellen ein.

Untersuchungen an p3-deletierten Phagen zeigten, dass während der Elongation, die mit Translokation der ssDNA in den Partikel unter Beteiligung des p5-Proteins einhergeht (1.5.1) der Phagenpartikel an der Cytoplasmamembran gebunden bleibt bis ein weiterer Komplex aus p5-ssDNA die Assemblierungsstelle passiert, um die Elongation mit Verpackung der Phagen-DNA durch p8 abzuschliessen (1.5.1)²³⁵. Phagen mit einem deletierten p3-Protein können sog. Polyphagen ausbilden, deren morphologische Struktur aus langen Phagenpartikeln mit mehreren Kopien einzelsträngiger DNA-Genome besteht²³⁶. Desweiteren wurde berichtet, dass trotz intakter p3- und p6-Proteine (wichtig für Assemblierung) 5 % der Phagenpartikel aufgrund von sekundären Elongationsrunden, die

keine Reinitiation für eine effiziente Inkorporation der ssDNA benötigen, eine doppelte Länge haben ²³⁷. Der isolierte Klon GXI dürfte aufgrund eines vorzeitigen Stopp-Codons kein p3 exprimieren (3.3.5, Abb. 3.27). Somit könnte der GXI-Phagenpartikel an der Membran gebunden bleiben bis ein weiterer p5-ssDNA Komplex die Assemblierungsstelle betritt und die Verpackung sowie Termination der Elongation vermittelt. Der produzierte Phagenüberstand bestünde dann aus Polyphagen, die mehrere Kopien ssDNA beinhalten. Polyphagenpartikel resultieren in einem erhöhten Signal im Phagen-ELISA, welches ebenfalls für GXI im Vergleich zum Wildtyp SamR2 beobachtet wurde (3.3.4, Abb. 3.26) ²³⁸. Eine Erklärung für die Infektiosität der Phagenpartikel, die mit dem Klon GXI produziert wurden, wäre die Fähigkeit von *E.coli* zur ribosomalen Leserasterverschiebung (3.3.5) ²³⁹. Manchmal wird im Phage-Display Verfahren beobachtet, dass Klone wie GXI angereichert werden (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Dübel, Institut für Biotechnologie, Tech. Universität Braunschweig). Während der Produktion des Phagenüberstands aus GXI könnte durch Decodierung des Quadrupletts das Leseraster von p3 in wenigen Fällen wiederhergestellt werden, was zu infektiösen Phagenpartikeln führen würde. Die wesentlich höhere Bindungsaffinität von GXI im Phagen-ELISA (3.3.4, Abb. 3.26), würde vermutlich auf die Abbildung einer höher affinen Variante auf der Phagenoberfläche zurückgeführt werden, die aufgrund der Leserasterverschiebung entstanden ist. Da die intakte Variante des Fusionproduktes GXI-p3 im Gegensatz zu GXI mit einem deletierten p3-Protein, was auf ein vorzeitiges Stopp-Codon im Leseraster des Klons GXI zurückzuführen ist, in der heterogenen Mischung des produzierten Phagenüberstands vermutlich unterrepräsentiert wird, war möglicherweise die Western Blot-Analyse (3.3.5, Abb. 3.28) nicht sensitiv genug, um den geringen Prozentsatz an Peptiden mit intaktem p3-Protein zu detektieren. Ausserdem dominierte in Sequenzierungen stets die Sequenz des GXI-Klons. Desweiteren bleibt zu beachten, dass der produzierte Phagenüberstand einen niedrigen Titer aufwies und eine Auftragung des Phagentiters gegen die optische Dichte im Phagen-ELISA die Bindungskurve von GXI fälschlicherweise sehr weit nach links verschieben könnte, was die beobachtete höhere Bindungsaffinität von GXI ebenfalls erklären würde.

4.3.3 *In vitro*- und *in vivo*-Analyse der Rev-Bindung der Klone GXI und GXI*

Um die Bindung des Klons GXI in einem anderen System zu untersuchen, wurde die Sequenz von GXI in das pGEX-Expressionssystem zur Herstellung von rekombinanten

Protein für einen *Pull down*-Assay (*in vitro*-Analyse) bzw. in das pECFP-C1 Expressionsplasmid für eine Co-Immunopräzipitation (*in vivo*-Analyse) eingesetzt. Analog dazu wurde der Klon GXI*, bei dem das Leseraster gezielt rekonstituiert wurde, analysiert (3.3.5, Abb. 3.27).

Das rekombinant hergestellte GST-GXI-Protein, welches in *E.coli* exprimiert wurde, zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp GST-SamR2 schwächere Bindung an Rev (3.3.5.1, Abb. 3.29). Demzufolge könnte *E.coli* tatsächlich in der Lage sein, durch eine ribosomale Leserasterverschiebung eine intakte Variante von GXI auszubilden, die eventuell die höhere Affinität vermittelt, aber nur zu einem geringen Prozentsatz produziert wird. Somit würde die Bindungsstärke *in vitro* indirekt negativ beeinflusst. Dafür würde das Ausbleiben der Interaktion in der Co-Immunopräzipitation (3.3.5.2, Abb. 3.30) sprechen, bei der der Klon GXI im eukaryotischen System exprimiert wurde und somit die Möglichkeit der ribosomalen Leserasterverschiebung bedingt durch *E.coli* nicht gegeben war. Die aus der Nucleotidsequenz auf Basis eines Triplett-Codes resultierende Aminosäuresequenz kann keinesfalls verantwortlich für die erhöhte Bindungsaffinität im Phagen-ELISA sein (3.3.4, Abb. 3.26).

Die Wiederherstellung des Leserasters im Klon GXI* konnte nicht zur Identifikation der verantwortlichen Sequenz des höher affinen Binders beitragen. GXI* zeigte eine schwache Bindung *in vitro* (3.3.5.1, Abb. 3.29), die vermutlich auf die Wiederherstellung des Leserahmens und eine Übereinstimmung der Sequenz mit dem Wildtyp SamR2 bis auf fünf Aminosäuren zurückzuführen ist (3.3.5, Abb. 3.27). In der *in vivo*-Analyse blieb die Bindung aus (3.3.5.2, Abb. 3.30). Es ist nicht auszuschliessen, dass *in vivo* die Interaktion beider Proteine durch weitere Cofaktoren beeinflusst wird und eine Veränderung von wenigen Aminosäuren die Bindung soweit schwächt, dass diese nicht detektiert werden kann ⁸⁶. Zumal bereits in der *in vitro*-Analyse im Vergleich zum Wildtyp SamR2 nur eine sehr schwache Interaktion nachgewiesen werden konnte.

4.4 Kurzzusammenfassung und Ausblick

Die Identifikation des Sam68-Bindebereichs im HI-viralen Rev-Protein als ein strukturelles Motiv, zu der Aminosäuren der Bereiche AS 18-24, AS 54-60 und AS 64-116 beitragen, zeigte, dass die Sam68-Interaktionsstellen zum Teil in den für die Oligomerisierung von Rev wichtigen Bereichen liegen. Daher könnte Sam68 als zellulärer Cofaktor des Rev-Proteins die

Ausbildung des Export-fähigen Ribonucleoprotein-Komplexes, welcher aus dem oligomeren Rev-Protein, der zu exportierenden viralen RNA und weiteren zellulären Faktoren besteht, unterstützen. Ein Teil des zusammengesetzten Sam68-Interaktionsbereichs (64-116) liegt in der C-terminalen Region von Rev, welche auch die Interaktionsstelle des Exportfaktors CRM-1 birgt. Co-Immunopräzipitationsanalysen mit CRM-1, Sam68 und Rev bzw. der C-terminalen Region von Rev könnten eine Beteiligung von Sam68 am CRM-1 abhängigen Export des Rev-RRE-Komplexes, welche kontrovers diskutiert wird, klären^{181,183}. Zudem würde ein EMSA-Assay genaueren Aufschluss über die in den FRET-Analysen beobachtete gestörte Oligomerisierungsfähigkeit der untersuchten Rev-Mutanten sowie ihren eingeschränkten Export RRE-haltiger RNA liefern. Durch Inkubation aufgereinigter Rev-Mutanten mit z.B. radioaktiv markierter RRE-RNA würden je nach Größe des Oligomers nach Auftrennung im Gel unterschiedliche Oligomerisierungszustände sichtbar gemacht werden. Da die Rev-Mutanten im proviralen Kontext keinen transdominant negativen Einfluss auf die Virusproduktion zeigten, könnte weiterhin mit einem *rev*-negativen Provirus untersucht werden, ob diese die Funktion des Wildtyp Rev komplementieren können bzw. Sam68 die Rev-Funktion ersetzen kann, was im quasi-lentiviralen Reportersystem partiell beobachtet werden konnte. Desweiteren könnte dadurch der Synergieeffekt von Sam68 genauer untersucht werden.

Die Rev-Interaktionsdomäne im zellulären Protein Sam68 konnte auf die lineare, Tyrosinreiche Region AS 364-410 im C-Terminus des Proteins eingegrenzt werden. Sam68-Mutanten mit einem deletierten Rev-Bindebereich konnten nach Herunterregulierung der Virusproduktion durch eine Sam68 Δ C-Mutante den dominant-negativen Effekt auf die Virusreplikation nicht komplementieren. Daher scheint die Rev/Sam68-Interaktion während der viralen Replikation eine essentielle Funktion zu erfüllen. Eine fehlende Rev-Interaktion im Reportersystem und proviralen Kontext zeigte keine Hemmung des Rev-abhängigen RNA-Exports bzw. der Virusproduktion, was aber auf die Präsenz des endogenen Sam68, dessen Funktion womöglich nicht beeinträchtigt wird, zurückzuführen sein könnte. Eine Sam68-*Knockout*-Zelllinie würde genauere Aussagen über den Einfluss der Sam68-Mutanten mit einem deletierten Rev-Bindebereich auf den Export bzw. die virale Replikation liefern. Zudem könnten in diesem Kontext die Variationen im Bezug auf den Synergieeffekt mit Rev ohne Einfluss des endogenen Sam68 aufgeklärt werden. Jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass durch eine Hemmung der endogenen Sam68-Expression

möglicherweise die zahlreichen zellulären Funktionen dieses Schlüsselproteins beeinträchtigt werden könnten (1.4.2).

Für die Entwicklung transdominanter Inhibitoren, welche die Rev/Sam68-Interaktion beeinflussen, wurde die lineare Rev-Interaktionsregion in Sam68 (SamR2 Aminosäuren 364-410) herangezogen. Im Gegensatz zu einem viralen Protein würde vermutlich ein zelluläres Protein eine geringere Immunantwort auslösen und daher eine bessere Verträglichkeit aufweisen. Zudem erleichtert ein linearer Bereich im Vergleich zu einem strukturellen Motiv die Randomisierung zur Generierung einer Bibliothek mit hochaffinen Varianten. Mittels Phagen-Display-Technologie konnte der potentiell höher affine Kandidat GXI selektiert werden. Während dieser im Phagen-ELISA eine deutlich höhere Affinität zu Rev im Vergleich zum Wildtyp SamR2 aufwies, blieb dieser Trend in den Interaktionsanalysen im zellfreien (*in vitro*) und zellulären (*in vivo*) System aus. Die Sequenzanalyse von GXI ergab, dass aufgrund einer Leserasterverschiebung kein funktionelles p3-Protein und damit auch keine infektiösen Phagen-Partikel entstehen dürften. Darüberhinaus kann das SamR2-Peptid so nicht inkorporiert werden. Da dennoch infektiöse Phagenpartikel erhalten wurden, kam es möglicherweise bei der Proteinbiosynthese in den Bakterien manchmal zu einer Verschiebung des Leserasters, die den p3-Leserahmen wiederherstellte. Eine massenspektrometrische Analyse der Proteine der aus dem Klon GXI produzierten Phagenpartikel könnte dabei helfen diese Vermutung zu bestätigen und die Aminosäuresequenz des potentiell vorhandenen p3-Fusionsproteins zu bestimmen.

5. Material

5.1 Organismen

5.1.1 Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Beschreibung
293T	Homo sapiens	Ad5/SV40 (T) transformierte Nierenepithelzellen (Numa, 1995) (ATCC: CRL-11268)

5.1.2 Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsd R1 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
BL21 (DE3)	<i>hsdS gal</i> (λ <i>CIts857</i>) <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>
GM2163	<i>F-ara-14leuB6</i> <i>fluA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6hisG4</i> <i>rfbD1 rpsL136(StrR)dam13::Tn9(CamR) xylA5mtl-1thi-1 mcrB1 hsdR2</i>
OmniMAX 2T1 R	F' { <i>proAB+ lacIq lacZ</i> Δ M15 Tn10(TetR) Δ (<i>ccdAB</i>)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD</i>
TG1	<i>supE hsd</i> Δ 5 <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F' [<i>traD36 proAB lacIq lacZ</i> Δ M15]

5.2 Medien

Medium	Zusammensetzung
LB ₀ (Luria Bertani)	1 % Bacto-Trypton 0.5 % Hefe-Extrakt 1 % NaCl mit NaOH ad pH 7.0
LB _{Amp}	100 μ g/ml Ampicillin in sterilem LB ₀
LB _{Kana}	25 μ g/ml Kanamycin in sterilem LB ₀
M9-MM	1x M9-Salze (1.28 % (w/v) Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 0.3 % (w/v) KH ₂ PO ₄ 0.05 % (w/v) NaCl 0.1 % (w/v) NH ₄ Cl 2 mM MgSO ₄ 0.1 mM CaCl ₂ 0.01 % (w/v) Thiamin 0.4 % (w/v) Glucose

2x YT	1.6 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) Hefeextrakt 0.5 % (w/v) NaCl pH 7.0
YT-AG	2x YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glukose
YT-AK	2x YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin
SOB	2.0 % (w/v) Trypton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 0.05 % (w/v) NaCl 2.5 mM MgCl ₂ pH 7.5
SOBAG	SOB-Medium mit zusätzlich 100 mM Glukose 100 µg/ml Ampicillin
SOC	SOB-Medium mit zusätzlich 20 mM Glukose
TB	1.2 % Trypton 2.4 % Hefeextrakt 72 mM K ₂ HPO ₄ 1 mM KH ₂ PO ₄ 0.4 % Glycerin
Plattenmedium	jeweiliges Medium mit 1.5 % Agar

5.3 Kitsysteme

Kit	Verwendung	Bezugsquelle
Qiagen DNA Midi Kit	Isolierung von pDNA	Qiagen (Hilden)
Qiagen DNA Maxi Kit	Isolierung von pDNA	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Isolierung von DNA aus Agarose	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Qiagen (Hilden)
StrataClone PCR Cloning Kit	Klonierung von PCR-Produkten	Stratagene (Waldbronn)

5.4 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung	Verwendung
Ammoniumsulfatlösung	3 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7.4	Pull down-Assay
AP-Färbelösung	100 mM Tris/HCl pH 9.5 50 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl	Western Blot
APS	10 % Ammoniumperoxodisulfat in H ₂ O	SDS-PAGE

<i>Bead</i> -Puffer	0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7.4	<i>Pull down</i> -Assay/ Bio-Panning
Blockingpuffer für Phagen-ELISA	2 % Milchpulver in PBS (w/v)	Phagen-ELISA
Blockingpuffer für Bio-Panning	5 % BSA in Waschpuffer für Bio-Panning	Bio-Panning/ Co-IP
Blockingpuffer für <i>Pull down</i> -Assay/ Co-IP	5 % BSA in PBS	<i>Pull down</i> -Assay/ Co-IP
Blockierlösung	5 % Milchpulver in TBS (w/v)	Western Blot
Coating-Puffer	1 M NaHCO ₃ 0.3 M Na ₂ CO ₃ pH 9.5	ELISA
Coomassie-Färbelösung	0.125 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 50 % (v/v) Ethanol 7 % (v/v) Essigsäure	SDS-PAGE
Coomassie-Entfärbelösung	7 % (v/v) Essigsäure	SDS-PAGE
DAPI-Färbelösung	0.5 µg/ml DAPI in PBS	IF
DNA-Probenpuffer (10x)	0.25 % Bromphenolblau (w/v) 0.25 % Xylencyanol (w/v) 30 % Glycerin (v/v)	Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen
ECL-Gebrauchslösung	1:1-Mischung der ECL-Lösungen 1 und 2	Western Blot
ECL-Lösung 1	2.5 mM Luminol in DMSO 0.4 mM p-Coumaric Acid in DMSO 0.1 M Tris/HCl pH 8.5	Western Blot
ECL-Lösung 2	0.1 M Tris/HCl pH 8.5 0.02 % H ₂ O ₂ (v/v)	Western Blot
Eindeckmedium	Mowiol 4-88 (ROTH 0713) 9 % (w/w) Mowiol 4-88 20 % (w/w) Glycerin 90 mM Tris pH 8.5	IF
Elutionspuffer für Bio-Panning	200 mM Glycin pH 9.0	Bio-Panning
GST-Elutionspuffer	20 mM reduziertes Glutathion, gelöst in Waschpuffer	Proteinaufreinigung
GST-Waschpuffer	100 mM Tris/HCl pH 8.0 150 mM NaCl 1 mM EDTA	Proteinaufreinigung
6xHis-Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0 300 mM NaCl 250 mM Imidazol	Proteinaufreinigung

6xHis-Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0 300 mM NaCl 20 mM Imidazol	Proteinaufreinigung
FACS-Puffer	1 % FKS (v/v) 0.1 % NaN ₃ (w/v) in PBS	FACS
Fixierungslösung	2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS	IF
IP-Puffer	500 mM NaCl 1 % NP-40 50 mM Tris/HCl pH 8.0 10 % Glycerol 2 mM EDTA	Co-IP
Laufpuffer (10x)	0.25 M Tris 1.92 M Glycin 1 % SDS (w/v)	SDS-PAGE
6xHis-Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0 300 mM NaCl 10 mM Imidazol	Proteinaufreinigung
NETN-Puffer	0.5 % Nonidet P-40 20 mM Tris/HCl pH 8.0 100 mM NaCl 1 mM EDTA	Proteinaufreinigung
Neutralisationspuffer für Bio-Panning	1 M Tris/HCl pH 9.0	Bio-Panning
Triton X-100	5 % Triton X-100 (v/v) in PBS	ELISA
PBS	7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄ 130 mM NaCl	allgemein
PBS/T	0.05 % Tween-20 (v/v) in PBS	ELISA/ IF
PEG/NaCl	20 % Polyethylenglycol-8000 2.5 M NaCl	PEG-Fällung
Ponceau-S-Lösung	0.2 % Ponceaurot (w/v) 1 % Essigsäure (v/v)	Western Blot
SDS-Probenpuffer nach Laemmli (5x)	312 mM Tris 5 % SDS (w/v) 2.5 mM EDTA 25 % Mercaptoethanol (v/v) Bromphenolblau pH 6.8	SDS-PAGE

RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8.0 150 mM NaCl 0.1 % SDS (w/v) 1 % Nonidet P-40 (w/v) 0.5 % Natriumdesoxycholat (w/v)	Herstellung von Zelllysaten
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8.0	Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen
TBS	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 7.5	allgemein
TMB-Substrat Gebrauchslösung	20:1-Mischung der TMB-Lösungen 1 und 2	ELISA
TMB-Lösung 1	30 mM C ₆ H ₇ K ₃ O ₈ pH 4.1	ELISA
TMB-Lösung 2	10 mM Tetramethylbenzidin 10 % Aceton (v/v) 90 % Ethanol (v/v) 0.3 % H ₂ O ₂ (v/v)	ELISA
Transferpuffer (10x)	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % Methanol (v/v)	Western Blot
Trypanblau-Lösung	0.5 % Trypanblau (w/v) in PBS	Zellzahlbestimmung
TTBS	0.05 % Tween-20 (v/v) in TBS	Western Blot
Waschpuffer für Bio-Panning	0.1 % Tween-20 (v/v) in PBS	Bio-Panning

5.5 Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pcDNA3.1(+)	Invitrogen
pGEX-KG	GE Healthcare
pcRev	Joachim Hauber (Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie & Immunologie, Hamburg)
pJH	Kalle Saksela (Haartman Institut, Universität Helsinki, Finnland)
pSEX81	Progen
pECFP-C1	Clontech/ Takara
pEYFP-C1	Clontech/ Takara
pcHA-Sam68	Axel Mann (RIMMH, Regensburg) ²⁴⁰

pECFP-YFP	Benedikt Asbach (RIMMH, Regensburg) ²¹⁹
pcHA-Sam68Δ410-443	Benedikt Asbach (RIMMH, Regensburg) ²¹⁹
pNL4-3	Accession-Nr.: AF324493.1, Referenz: ADACHI et al., 1986
pcUTR-wtgag-RRE	Graf <i>et al.</i> , 2000 ²¹⁵
pcUTR-hivGFP-RRE	Graf <i>et al.</i> , 2006 ²¹⁷

5.6 Oligonucleotide

Oligonucleotid	Sequenz (5'→3')
pGEX5	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pQE-5	CAATTGTGAGCGGATAACAATTTTC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pJHf	CCTATTGCCTACGGCAGCC
CMVf	GTAGGCGTGTACGGTGGGAGG
Sam68-fwd AS411-Ü320	ACCAGTAAGGTATGGCCAGGACGACTG
Sam68-rev AS320-Ü411	CCTGGCCATACCTTACTGGTGTACCAG
Sam68-AS320-rev <i>EcoRI</i>	GGCGAATTCTTACCTTACTGGTGTACCACGT
Sam68-AS320-rev <i>KpnI</i>	GCGGTACCTTACCTTACTGGTGTACCACGT
Sam68-fwd <i>EcoRI</i>	GAGGAATTCCATGCAGCGCCGGGAC
Sam68-rev <i>KpnI</i>	GCGGTACCTTAATAACGTCCATATGGGTGCTCT
Sam68-rev AS320-U331	CACGCTCGCCTTACTGGTGTACCACGTACCAAAG
Sam68-fwd AS331-U320	CCAGTAAGGCGAGGCGTGCCACCC
Sam68-rev delta C <i>KpnI</i>	CTCGGTACCTTACACAGTGGCACCTCTGG
Rev-rev <i>KpnI</i>	CGCGGTACCCTATTCCTTTAGCTCCTGACTCC
Rev-fwd <i>EcoRI</i>	GCGAATTCCATGGCAGGAAGAAGCGGAGAC
HA-Sam68-fwd <i>KpnI</i>	GCGGTACCATGGCTTCATATCCTTACGATGTTCC
Sam68- <i>EcoRI</i> rev	GAGGAATTCCATGCAGCGCCGGGAC
Sam68-rev delta C <i>EcoRI</i>	GCGAATTCTTACACAGTGGCACCTCTGGTGATG
Mut_1 rev-fwd- <i>EcoRI</i> AS35	GAGGAATTCCTCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAG
Mut_2 rev-fwd- <i>EcoRI</i>	GAGGAATTCATGGCAGGAAGAAGCGGAG
Rev-fwd AS 25	GGCAGTCAGAAGCAACCCACCTCCAATCC
Rev-rev AS 17	GTGGGTTGCTTCTGACTGCCTTGAGGAGG
Rev-rev- <i>HindIII</i> *	GAGAAGCTTCTATTCCTTTAGCTCCTGACTCCAATATTG
Rev-rev AS 53	GATAAGTGCTATGGATCTGTCTCTGTCTCTCTC

Rev-fwd AS 61	ACAGATCCATAGCACTTATCTGGGACGATCTG
Rev-rev AS 63-HindIII	GAGAAGCTTCTAATAAGTGCTAAGGATCCGTTAC
Rev-rev AS63-KpnI	CGCGGTACCCTAATAAGTGCTAAGGATCCGTTAC
Rev-fwd-HindIII-AS35	GAGAAGCTTCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAG
Rev-rev Strep-EcoRI	GAGGAATTCTACTTCTCGAACTGGGGTGGGACCATTCTTTAGCTCCTGACTCCAAT ATTGTAGG
Rev-rev AS63 Strep-EcoRI	GAGGAATTCTACTTCTCGAACTGGGGTGGGACCAATAAGTGCTAAGGATCCGTTCA CTAA
Rev-fwd HindIII	GAGAAGCTTATGGCAGGAAGAAGCGG
RGS-6xHIS-Rev-rev	GAGAAGCTTCTAGTGATGGTGATGGTGATGCGATCCTCTTTCTTTAGCTCCTGACTCC AATATTGTAGG
AS63-RGS-6xHIS-Rev-rev -	GAGGAAGCTTCTAGTGATGGTGATGGTGATGCGATCCTCTATAAGTGCTAAGGATCCG TTCCTAA
Sam68-rev AS329-U411	CCTGGCCATACACAGTGGCACCTCTGGTG
Sam68-fwd AS411-U329	TGCCACTGTGTATGGCCAGGACGACTG
Sam-Rev-rev Fus	CTTCCTGCCATATAACGTCCATATGGGTGCTCT
Sam-Rev-fwd Fus	TGGACGTTATATGGCAGGAAGAAGCGGAGAC
HA-Sam80-fwd KpnI	GAGGGTACCATGGCTTCATATCCTTACGATGTTCCAGACTACGCTACTCGAGGCGTGC CACCCCCAC
Sam80-XbaI rev	CCGCTCTAGATTAAGCTTCATAAGAATCTTGAACCTCCCCA
80aa-Peptid2 SalI rev	CTCGTCGACTTAAGCTTCATAAGAATCTTGAACCTC
80aa-Peptid1 SalI rev	GCGTCGACTTATCTTCATATGTTTCTGGTGCAGGAGGTGG
80aa-Peptid1 EcoRI	GAGGAATTCCATGACTCGAGGCGTGCCACCC
80aa-Peptid2 EcoRI	GAGGAATTCCATGGAAACATATGAAGAATATGGATATGATG
pSEXfwd 200	CAGTGAGCGCAACGCAATTA
pSEXdel Fus fwd	TCAGCCGGCCGGATCCAAAGATATCAGAGCTGAAACTGTTG
pSEXdel NheI	CTCGCTAGCTGATCATTAGCACAGGC
pSEXdel XhoI	GAGCTCGAGAGCGGGCAGTGA
pSEXdel Fus rev	CTTTGGATCCGGCCGGCTGAGCTGCCAGCA
pNheI-Rev del1-34 fwd	GCGGCTAGCATGCGACAGGCCCGAAGGAATA
pAgeI-linker-Rev rev	TCGACCGGTGCACCTGCTCCTTCTTTAGCTCCTGACTCCAATA
pNheI-Rev fwd	GCGGCTAGCATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAG
pAgeI-linker-Rev del64-116 rev	TCGACCGGTGCACCTGCTCCATAAGTGCTAAGGATCCGTTCC
Sam R2 NcoI fwd	GACCATGGCGAAACATATGAAGAATATGGATAT
Sam R2 NotI rev	CTGCGGCCGACGCTTCATAAGAATCTT
pSEX-SamR2 lib fwd	GAATTCAGCTCAGCCGGCCATGGCG

pSEX-SamR2 lib rev	CTTGCTCTTTGGATCCAGCGGCCGC
pSEX.fwd	TGTGAGCGGATAACAATTTAC
SamR2 lib fwd	CAGCTCAGCCGGCCATGGCGgaaacatatgaagaatatggatatgatgatacacatagc agaacaaagttacgaaggctacgaaggctattacagccagagtC
SamR2 lib rev	TCTTTGGATCCAGCGGCCGCagcttcataagaatcttgaacctccccatgtccatagt cataatattctgagtcoccttgactctggctgtaatagccttC
Klon42GXI <i>EcoRI</i> fwd	GCGGAATTCGGATACATATGAAGAATATGG
Klon42GXI <i>Sall</i> rev	CTGTCGACGCAGCTTCATACG
K42 Fus Glu fwd	AGTTACGTGGCTAAGGAAGGCTATTACAGCCAG
K42 Fus Glu rev	CTGGCTGTAATAGCCTTCCTTAGCCACGTAAC
pGEX-3	GCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
ExFP 1266 fwd	CATGGTCTGCTGGAGTTCGTG
ExFP 548 fwd	GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGG
pExFP3'	CTCTACAAATGTGGTATGGC
Sam68 488 fwd	CTGAAAGAGCGAGTGCTGATACC

5.7 Chemikalien, Enzyme und Materialien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma (Deisenhofen), Fluka Chemie (Buchs, CH) oder Merck (Darmstadt) in der Reinheitsstufe *pro analysis* bezogen. Abweichende Herstellerfirmen der verwendeten Reagenzien, Enzyme und Chemikalien werden an entsprechender Stelle genannt.

5.8 Antikörper

Primäre Antikörper	Quelle/Herkunft	Verdünnung
Sam68 C-20 (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:5000
GFP (FL) (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:500
GAPDH-HRP (Maus)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	1:35000
pIII (Maus)	MoBiTec, Göttingen	1:1000
β-Actin (Maus)	Sigma-Adrich, Missouri, USA	1:5000
HA (Ratte)	Roche Diagnostics, Mannheim	1:500
GST-Tag (Ziege)	Biomol/Rockland, Hamburg	1:1000
Strep-Tag (Maus)	Qiagen, Hilden	1:1000
M13-HRP (Maus)	Amersham Biosciences, Freiburg	1:5000
MOI	Polymun, Wien, Österreich	1:4000

37G12	Polymun, Wien, Österreich	1:10000
Streptavidin-HRP	Roche, Mannheim	1:10000
Sekundäre Antikörper	Quelle/Herkunft	Verdünnung
rabbit-HRP	Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA	1:5000
goat-HRP	Dako, Hamburg	1:2000
rat-HRP	Dako, Hamburg	1:2000
mouse-HRP	Dako, Hamburg	1:2000
mouse-AP	Biorad, München	1:5000

5.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien mit den entsprechenden Herstellern sind an den jeweiligen Stellen im Text vermerkt.

5.10 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von „Microsoft Office Home and Student 2007“ erstellt. Abbildungen wurden mit „GraphPad Prism 4.0“, „Cn3D 4.1“ und „Adobe Photoshop CS5 Extended“ angefertigt. Zur Auswertung und Bearbeitung von Nucleotidsequenzen sowie Erstellung von Sequenzvergleichen dienten die Programme „pDRAW32“ (Acaclone, Frederiksberg, DK), „GENTle“ (Magnus Manske, Köln) und „BioEdit version 5.0.6“ (Tom Hall, North Carolina State University, USA).

Bei der Literatursuche halfen das OPAC-System der Universität Regensburg sowie die „Medline“ Datenbank des NCBI.

6. Methoden

6.1 Kulturhaltung

6.1.1 Eukaryotische Zellen

6.1.1.1 Kultivierung

Sämtliche für die Kulturhaltung notwendigen Reagenzien wurden von Pan Biotech (Aidenbach) oder Invitrogen (Darmstadt) bezogen und waren auf Zellkultureignung getestet. Kulturgefäße für Zellen stammten von BD Biosciences (Heidelberg). Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ herangezogen. Für die Kultivierung aller Zelllinien wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Darmstadt) mit 10 % fötalem Kälberserum (Invitrogen, Darmstadt) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung verwendet. Für die Subkultivierung wurden adhärente Zellen mit PBS gewaschen und anschliessend durch Inkubation mit einer Trypsin-Lösung (0.05 % Trypsin, Invitrogen, Darmstadt) vom Boden der Kulturschale gelöst. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 300 g) und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Ein Zehntel dieser Suspension wurde in ein neues Kulturgefäß überführt und mit ausreichend Medium versehen.

6.1.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) bestimmt. 100 µl einer gründlich in PBS resuspendierten Zellkultur wurden mit der gleichen Menge einer Trypanblau-Lösung vermischt. Der Farbstoff dringt in tote Zellen ein, wodurch diese leicht von den lebenden, leuchtend transparenten Zellen zu unterscheiden sind. Die ermittelte Zellzahl n der in 2x16 Kleinquadraten gezählten Zellen entspricht dabei, unter Berücksichtigung der Verdünnung, einer Konzentration von $n \times 10^4$ Zellen pro ml.

6.1.2 Prokaryotische Zellen

Die Anzucht von *E. coli* Bakterienkulturen erfolgte in LB₀-Flüssigmedium oder auf LB₀-Agarplatten. Zur Selektion positiver Transformanden wurden dem Medium Ampicillin

(100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) zugesetzt bzw. LB_{Amp^r} oder LB_{Kana}-Platten verwendet.

Die Anzucht von TG1-Zellen zur Phagenproduktion und Titerbestimmung erfolgte auf M9-MM-Platten oder in M9-MM-Flüssigmedium.

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 DNA-Methoden

6.2.1.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Zur Charakterisierung hergestellter Subklone erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA nach dem Protokoll der Alkalischen Schnelllyse (Minipräp, nach Birnboim & Doly, 1979). Für die Transfektion eukaryotischer Zellen wurde die benötigte Plasmid-DNA über „QIAGEN-tip“-Säulen (Anionenaustauscherchromatographie) nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) gereinigt. Je nach gewünschter Ausbeute wurden Midi- („QIAGEN-tip 100“) oder Maxi- („QIAGEN-tip 500“) Säulen verwendet. Die DNA wurde nach der Elution mit 10 mM Tris/HCl pH 8.0 aliquotiert und bei -20°C gelagert.

6.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Quantität und Qualität von Plasmid-DNA wurde nach Aufreinigung im Nanodrop (Peqlab, Erlangen) mittels UV-Absorption vermessen. Hierzu wurden 1.5 µl der in Tris/HCl pH 8.0 aufgenommenen DNA auf das optische Podest des Geräts pipettiert, das vorher mit Tris/HCl pH 8.0 kalibriert wurde. Die Software des Gerätes berechnet Konzentration und Qualitätsparameter der DNA. Das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

6.2.1.3 Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren

Zur Analyse der aus *E. coli* isolierten Plasmid-DNA sowie für präparative Zwecke wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen enzymatisch geschnitten. Eine Einheit (U) bezeichnet dabei die Enzymaktivität, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei optimalen Temperatur-, Puffer- und pH-Bedingungen vollständig zu schneiden. Zur Charakterisierung gereinigter Plasmid-DNA wurde 1 µg DNA mit 10 U Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) und 1/10 Volumen des entsprechenden

Restriktionspuffers gemäß Herstellerangaben in einem 20µl Ansatz für 1h bei angegebener Temperatur geschnitten.

Für präparative Zwecke wurden in einem Standardansatz 2 bis 5 µg Plasmid-DNA mit je 25 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 50 µl ebenfalls mit 1/10 Volumen Restriktionspuffer für 2 h bei entsprechender Temperatur inkubiert.

6.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente (100 bp bis 10 kb) hinsichtlich ihrer Länge erfolgte in Agarose-Gelen bei konstanter Spannung (5 V/cm). Je nach errechneter Größe der DNA-Fragmente wurde zwischen 0.8 % und 2.0 % Agarose in TBE-Puffer eingewogen, unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 50ng/ml versetzt. Die DNA-Fragmente wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und zur Abschätzung der Fragmentgröße zusammen mit einem entsprechenden DNA-Längen-Standard von NEB aufgetragen. Die Detektion der DNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirms (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm.

6.2.1.5 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Um reine DNA zu erhalten, wurden elektrophoretisch aufgetrennte Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

6.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die verwendeten Vektoren wurden stets mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (CIP = *caly intestine phosphatase*; Roche, Mannheim) behandelt, um die Phosphate freier 5'-Enden zu entfernen. Dreißig Minuten vor Ende des Restriktionsverdau wurden dem Ansatz jeweils 2 U CIP zugegeben. Auf diese Weise wird eine Religierung des Vektors verhindert.

6.2.2 Herstellung der Plasmide

Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurde das jeweilige Insert entweder mit Hilfe entsprechender Restriktionsenzyme endonukleolytisch aus einem Vektor gespalten oder durch PCR-Amplifikation generiert, wobei entsprechende Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme an die eingesetzten Oligonucleotide

fusioniert waren. In beiden Fällen wurde die DNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung isoliert, mit einem entsprechend präparierten Zielvektor ligiert und der Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert.

6.2.2.1 Prokaryotische Expressionsplasmide

Zielvektor	Insert	Schnittstellen	Konstrukt
pGEX-KG	Rev Template: pcRev Primer: Mut_2 rev-fwd EcoRI & Rev-rev-HindIII*	EcoRI/HindIII	pGEX-Rev
pGEX-KG	RevΔ1-34 Template: pcRev Primer: Mut_1 rev-fwd-EcoRI AS35 & Rev-rev-HindIII*	EcoRI/HindIII	pGEX-RevΔ1-34
pGEX-KG	RevΔ18-24 Template: pcRev Primer Fragment 1: Mut_2 rev-fwd EcoRI & Rev-rev AS17 Primer Fragment 2: Rev-fwd AS25 & Rev-rev-HindIII* Primer für Fusion: Mut_2 rev-fwd EcoRI & Rev-rev-HindIII*	EcoRI/HindIII	pGEX-RevΔ18-24
pGEX-KG	RevΔ54-60 Template: pcRev Primer Fragment 1: Mut_2 rev-fwd EcoRI & Rev-rev AS53 Primer Fragment 2: Rev-fwd AS61 & Rev-rev-HindIII* Primer für Fusion: Mut_2 rev-fwd EcoRI & Rev-rev-HindIII*	EcoRI/HindIII	pGEX-RevΔ54-60
pGEX-KG	RevΔDouble Template: pcRev Primer Fragment 1: Mut_2 rev-fwd EcoRI & Rev-rev AS17 Primer Fragment 2: Rev-fwd AS25 & Rev-rev AS53 Primer Fragment 3: Rev-fwd AS61 & Rev-rev-HindIII* Primer für Fusion Fragment 1&2: Mut_2 rev-fwd EcoRI & Rev-rev AS53 = Fragment 4 Primer für Fusion Fragment 3&4: Mut_2 rev-fwd EcoRI & Rev-rev-HindIII*	EcoRI/HindIII	pGEX-RevΔDouble
pGEX-KG	RevΔ64-116 Template: pcRev Primer: Mut_2 rev-fwd EcoRI & Rev-rev AS63-HindIII	EcoRI/HindIII	pGEX-RevΔ64-116

pGEX-KG	Rev-His Template: pcRev Primer: Mut_2 rev-fwd EcoRI & RGS-6xHIS-Rev-rev	EcoRI/HindIII	pGEX-Rev-His
pGEX-KG	RevΔ1-34-His Template: pcRev Primer: Mut_1 rev-fwd-EcoRI AS35 & RGS-6xHIS-Rev-rev	EcoRI/HindIII	pGEX-RevΔ1-34-His
pGEX-KG	RevΔ18-24-His Template: pGEX-RevΔ18-24 Primer: Mut_2 rev-fwd EcoRI & RGS-6xHIS-Rev-rev	EcoRI/HindIII	pGEX-RevΔ18-24-His
pGEX-KG	RevΔ54-60-His Template: pGEX-RevΔ54-60 Primer: Mut_2 rev-fwd EcoRI & RGS-6xHIS-Rev-rev	EcoRI/HindIII	pGEX-RevΔ54-60-His
pGEX-KG	RevΔDouble-His Template: pGEX-RevΔ Double Primer: Mut_2 rev-fwd EcoRI & RGS-6xHIS-Rev-rev	EcoRI/HindIII	pGEX-RevΔDouble-His
pGEX-KG	RevΔ64-116-His Template: pcRev Primer: Mut_2 rev-fwd EcoRI & AS63-RGS-6xHIS-Rev-rev -	EcoRI/HindIII	pGEX-RevΔ64-116-His
pGEX-KG	Sam80 Template: pcHA-Sam68 Primer: 80aa-Peptid1 EcoRI & 80aa-Peptid2 Sall rev	EcoRI/Sall	pGEX-Sam80
pGEX-KG	SamR1 Template: pcHA-Sam80 Primer: 80aa-Peptid1 EcoRI & 80aa-Peptid1 Sall rev	EcoRI/Sall	pGEX-SamR1
pGEX-KG	SamR2 Template: pcHA-Sam80 Primer: 80aa-Peptid2 EcoRI & 80aa-Peptid2 Sall rev	EcoRI/Sall	pGEX-SamR2
pGEX-KG	GXI Template: pSEX-GXI, isolierte Sequenz aus Bio-Panning Primer: Klon42GX1 EcoRI fwd & Klon42GX1 Sall rev	EcoRI/Sall	pGEX-GXI
pGEX-KG	GXI* Template: pGEX-GXI Primer: Klon42GX1 EcoRI fwd & K42 Fus Glu rev	EcoRI/Sall	pGEX-GXI*

Template: pSEX-SamR2
 Primer: K42 Fus Glu fwd & 80aa-Peptid2 Sall rev
 Primer für Fusion: Klon42GXI EcoRI & 80aa-Peptid2 Sall rev

6.2.2.2 Eukaryotische Expressionsplasmide

Zielvektor	Insert	Schnittstellen	Konstrukt
pcDNA3.1(+)	HA-Sam68Δ330-443 Template: pcHA-Sam68 Primer: HA-Sam68-fwd KpnI & Sam68-rev delta C EcoRI	KpnI/EcoRI	pcHA-Sam68Δ330-443
pcDNA3.1(+)	HA-Sam68Δ321-330 Template: pcHA-Sam68 Primer Fragment 1: HA-Sam68-fwd KpnI & Sam68-rev AS320-U331 Primer Fragment 2: Sam68-fwd AS331-U320 & Sam68-EcoRI rev Primer für Fusion: HA-Sam68-fwd KpnI & Sam68-EcoRI rev	KpnI/EcoRI	pcHA-Sam68Δ321-330
pcDNA3.1(+)	HA-Sam68Δ321-410 Template: pcHA-Sam68 Primer Fragment 1: HA-Sam68-fwd KpnI & Sam68-rev AS320-U411 Primer Fragment 2: Sam68-fwd AS411-U320 & Sam68-EcoRI rev Primer für Fusion: HA-Sam68-fwd KpnI & Sam68-EcoRI rev	KpnI/EcoRI	pcHA-Sam68Δ321-410
pcDNA3.1(+)	HA-Sam68Δ321-443 Template: pcHA-Sam68 Primer: HA-Sam68-fwd KpnI & Sam68-AS320-rev EcoRI	KpnI/EcoRI	pcHA-Sam68Δ321-443
pcDNA3.1(+)	HA-Sam68Δ330-410 Template: pcHA-Sam68 Primer Fragment 1: HA-Sam68-fwd KpnI & Sam68-rev AS329-U411 Primer Fragment 2: Sam68-fwd AS411-U329 & Sam68-EcoRI rev Primer für Fusion: HA-Sam68-fwd KpnI & Sam68-EcoRI rev	KpnI/EcoRI	pcHA-Sam68Δ330-410
pcDNA3.1(+)	HA-Sam80 Template: pcHA-Sam68 Primer: HA-Sam80-fwd KpnI & Sam80-XbaI rev	KpnI/EcoRI	pcHA-Sam80
pcDNA3.1(+)	HA-Sam68-Rev-Strep Template: pcHA-Sam68	KpnI/EcoRI	pcHA-Sam68-Rev-Strep

	<p>Primer Fragment 1: HA-Sam68-fwd KpnI & Sam-Rev-rev Fus</p> <p>Template: pcRev</p> <p>Primer Fragment 2: Sam-Rev-fwd-Fus & Rev-rev Strep-EcoRI</p> <p>Primer für Fusion: HA-Sam68-fwd KpnI & Rev-rev Strep-EcoRI</p>		
pEYFP-C1	<p>Sam68Δ330-443</p> <p>Template: pcHA-Sam68</p> <p>Primer: Sam68-fwd EcoRI & Sam68-rev delta C KpnI</p>	EcoRI/KpnI	pEYFP-Sam68 Δ 330-443
pEYFP-C1	<p>Sam68Δ321-330</p> <p>Template: pcHA-Sam68</p> <p>Primer Fragment 1: Sam68-fwd EcoRI & Sam68-rev AS320-U331</p> <p>Primer Fragment 2: Sam68-fwd AS331-U320 & Sam68-rev KpnI</p> <p>Primer für Fusion: Sam68-fwd EcoRI & Sam68-rev KpnI</p>	EcoRI/KpnI	pEYFP-Sam68 Δ 321-330
pEYFP-C1	<p>Sam68Δ321-410</p> <p>Template: pcHA-Sam68</p> <p>Primer Fragment 1: Sam68-fwd EcoRI & Sam68-rev AS320-Ü411</p> <p>Primer Fragment 2: Sam68-fwd AS411-Ü320 & Sam68-rev KpnI</p> <p>Primer für Fusion: Sam68-fwd EcoRI & Sam68-rev KpnI</p>	EcoRI/KpnI	pEYFP-Sam68 Δ 321-410
pEYFP-C1	<p>Sam68Δ321-443</p> <p>Template: pcHA-Sam68</p> <p>Primer: Sam68-fwd EcoRI & Sam68-rev AS320 KpnI</p>	EcoRI/KpnI	pEYFP-Sam68 Δ 321-443
pEYFP-C1	<p>Sam68</p> <p>Template: pcHA-Sam68</p> <p>Primer: Sam68-fwd EcoRI & Sam68-rev KpnI</p>	EcoRI/KpnI	pEYFP-Sam68
pECFP-C1	<p>Sam68</p> <p>Template: pcHA-Sam68</p> <p>Primer: Sam68-fwd EcoRI & Sam68-rev KpnI</p>	EcoRI/KpnI	pECFP-Sam68
pEYFP-C1	<p>Sam68Δ330-410</p> <p>Template: pcHA-Sam68Δ330-410</p> <p>Primer: Sam68-fwd EcoRI & Sam68-rev KpnI</p>	EcoRI/KpnI	pEYFP-Sam68 Δ 330-410
pEYFP-C1	<p>Sam68Δ410-443</p> <p>Template: YFP-Sam68 & HA-Sam68Δ410-443</p>	EcoRI/KpnI	pEYFP-Sam68 Δ 410-443

Verdau mit EcoRI & KpnI			
pEYFP-C1	Sam80 Template: pcHA-Sam68 Primer: 80aa-Peptid1 EcoRI & 80aa-Peptid2 Sall rev	EcoRI/Sall	pEYFP-Sam80
pEYFP-C1	SamR1 Template: pcHA-Sam80 Primer: 80aa-Peptid1 EcoRI & 80aa-Peptid1 Sall rev	EcoRI/Sall	pEYFP-SamR1
pEYFP-C1	SamR2 Template: pcHA-Sam80 Primer: 80aa-Peptid2 EcoRI & 80aa-Peptid2 Sall rev	EcoRI/Sall	pEYFP-SamR2
pECFP-C1	SamR1 Template: pcHA-Sam80 Primer: 80aa-Peptid1 EcoRI & 80aa-Peptid1 Sall rev	EcoRI/Sall	pECFP-SamR1
pECFP-C1	SamR2 Template: pcHA-Sam80 Primer: 80aa-Peptid2 EcoRI & 80aa-Peptid2 Sall rev	EcoRI/Sall	pECFP-SamR2
pcDNA3.1(+)	Rev-Strep Template: pcRev Primer: Rev-fwd HindIII & Rev-rev Strep-EcoRI	HindIII/EcoRI	pcRev-Strep
pcDNA3.1(+)	Rev Δ 1-34-Strep Template: pcRev Primer: Rev-fwd-HindIII-AS35 & Rev-rev Strep-EcoRI	HindIII/EcoRI	pcRev Δ 1-34-Strep
pcDNA3.1(+)	Rev Δ 18-24-Strep Template: pGEX-Rev Δ 18-24 Primer: Rev-fwd HindIII & Rev-rev Strep-EcoRI	HindIII/EcoRI	pcRev Δ 18-24-Strep
pcDNA3.1(+)	Rev Δ 54-60-Strep Template: pGEX-Rev Δ 54-60 Primer: Rev-fwd HindIII & Rev-rev Strep-EcoRI	HindIII/EcoRI	pcRev Δ 54-60-Strep
pcDNA3.1(+)	Rev Δ Double-Strep Template: pGEX-Rev Δ Double Primer: Rev-fwd HindIII & Rev-rev Strep-EcoRI	HindIII/EcoRI	pcRev Δ Double-Strep
pcDNA3.1(+)	Rev Δ 64-116-Strep Template: pcRev	HindIII/EcoRI	pcRev Δ 64-116-Strep

	Primer: Rev-fwd HindIII & Rev-rev AS63 Strep-EcoRI		
pECFP-C1	Rev Template: pcRev Primer: Rev-fwd-EcoRI & Rev-rev-KpnI	EcoRI/KpnI	pECFP-Rev
pECFP-C1	RevΔ1-34 Template: pcRev Primer: Mut_1 rev-fwd-EcoRI AS35 & Rev-rev-KpnI	EcoRI/KpnI	pECFP-RevΔ1-34
pECFP-C1	RevΔ18-24 Template: pGEX-RevΔ18-24 Primer: Rev-fwd-EcoRI & Rev-rev-KpnI	EcoRI/KpnI	pECFP-RevΔ18-24
pECFP-C1	RevΔ54-60 Template: pGEX-RevΔ54-60 Primer: Rev-fwd-EcoRI & Rev-rev-KpnI	EcoRI/KpnI	pECFP-RevΔ54-60
pECFP-C1	RevΔDouble Template: pGEX-RevΔ Double Primer: Rev-fwd-EcoRI & Rev-rev-KpnI	EcoRI/KpnI	pECFP-RevΔDouble
pECFP-C1	RevΔ64-116 Template: pcRev Primer: Rev-fwd-EcoRI & Rev-rev AS63-KpnI	EcoRI/KpnI	pECFP-RevΔ64-116
pECFP-C1	Rev-linker Template: pECFP-Rev Primer: pNheI-Rev fwd & pAgeI-linker-Rev rev	AgeI/NheI	pERev-CFP
pEYFP-C1	Rev-linker Template: pECFP-Rev Primer: pNheI-Rev fwd & pAgeI-linker-Rev rev	AgeI/NheI	pERev-YFP
pECFP-C1	RevΔ1-34-linker Template: pECFP-RevΔ1-34 Primer: pNheI-Rev del1-34 fwd & pAgeI-linker-Rev rev	AgeI/NheI	pERevΔ1-34-CFP
pECFP-C1	RevΔ18-24-linker Template: pECFP-RevΔ18-24 Primer: pNheI-Rev fwd & pAgeI-linker-Rev rev	AgeI/NheI	pERevΔ18-24-CFP
pECFP-C1	RevΔ54-60-linker Template: pECFP-RevΔ54-60 Primer: pNheI-Rev fwd & pAgeI-linker-Rev rev	AgeI/NheI	pERevΔ54-60-CFP
pECFP-C1	RevΔDouble-linker	AgeI/NheI	pERevΔDouble-CFP

	Template: pECFP-RevΔ Double Primer: pNheI-Rev fwd & pAgeI-linker-Rev rev		
pECFP-C1	RevΔ64-116-linker Template: pECFP-RevΔ 64-116 Primer: pNheI-Rev fwd & pAgeI-linker-Rev del64-116 rev	AgeI/NheI	pERevΔ64-116-CFP
pECFP-C1	GXI Template: pSEX-GXI, isolierte Sequenz aus Bio-Panning Primer: Klon42GXI EcoRI fwd & Klon42GXI Sall rev	EcoRI/Sall	pECFP-GXI
pECFP-C1	GXI* Template: pGEX-GXI Primer: Klon42GXI EcoRI fwd & K42 Fus Glu rev Template: pSEX-SamR2 Primer: K42 Fus Glu fwd & 80aa-Peptid2 Sall rev Primer für Fusion: Klon42GXI EcoRI & 80aa-Peptid2 Sall rev	EcoRI/Sall	pECFP-GXI*

6.2.2.3 Phagemide

Zielvektor	Insert	Schnittstellen	Konstrukt
pSEX81	SamR2 Template: pECFP-SamR2 Primer: Sam R2 NcoI fwd & SamR2 NotI rev	NcoI/NotI	pSEX-SamR2
pSEX81	- Template: pSEX81 Primer Fragment 1: pSEXdel NheI & pSEXdel Fus fwd Primer Frgament 2: pSEXdel XhoI & pSEXdel Fus rev Primer für Fusion: pSEXdel NheI & pSEXdel XhoI	NcoI/NotI	pSEX81ΔAb
pJH	SamR2 Template: pECFP-SamR2 Primer: Sam R2 NcoI fwd & SamR2 NotI rev	NcoI/NotI	pJH-SamR2

6.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Amplifikationen wurden im „iCycler“ der Firma Biorad (München), im „Mastercycler gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) oder im „GeneAmp PCR System 2400“ der Firma Perkin Elmer (Rodgau) durchgeführt. Die PCR-Reaktionsansätze wurden in sterilen 0.2 ml PCR-Softtubes der Firma Biozym (Hess Oldendorf) nach folgendem Schema angesetzt:

Volumen	Komponente
50-100 ng	Template-DNA
1 µl	10 mM dNTP (Obiogene, Heidelberg)
1 µl	10 µM forward-Oligonucleotid
1 µl	10 µM reverse-Oligonucleotid
5 µl	10x Thermopol-Puffer
1 µl	Deep-Vent DNA-Polymerase (2 U/µl)
ad 50 µl	H ₂ O _{bidest}

Die eingesetzte „Deep Vent“-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) aus dem thermophilen Eubakterium *Pyrococcus spec.* ist eine hitzestabile, hochprozessive (45 s/kb), DNA-abhängige DNA-Polymerase mit proof-reading Aktivität. Die Amplifikation der DNA fand mittels des angegebenen Drei-Schritt-Temperaturprogrammes statt, das den Bedürfnissen der jeweiligen Oligonucleotide und des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst wurde.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiation	95°C	2 min
30 Zyklen der 3-Stufen-PCR:		
Denaturierung	95°C	45 s
Annealing	ca.56°C *	45 s
Elongation	72°C	45 s/kb
Endelongation	72°C	10 min
	4°C	∞

*Die *Annealingtemperatur* wurde je nach Primerpaar ca. 2°C unter der errechneten Schmelztemperatur T_m gewählt.

6.2.4 Primerannealing

Das Primerannealing wurde im „Mastercycler gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Hierfür wurde je 1 µg forward-Oligonucleotid und reverse-Oligonucleotid mit 2 µl 10x Thermopol-Puffer versetzt und auf 20 µl Gesamtansatz mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Folgendes Programm wurde verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	95°C	2 min
2.	95°C -0.5° + 0.00 R= 3.0°/s + 0.0°/s G= 0.0°	30 s
3.	GOTO 2. Rep 80x	
4.	Pause	∞

6.2.5 Sequenzierung von DNA nach Sanger

Alle hergestellten Plasmide wurden durch Sequenzierung (Geneart AG, Regensburg) verifiziert. Hierzu wurden 200-300 ng DNA mit 1 µl des 10 µM Sequenzierungsoligonucleotids versetzt und mit H₂O_{bidest} auf 8 µl aufgefüllt.

6.2.6 Klonierung von DNA

6.2.6.1 Ligierung von DNA-Fragmenten

Zu ligierende DNA-Fragmente wurden in den molaren Verhältnissen Vektor zu Insert von 1:1 bis 1:4 für die Ligierung eingesetzt. Der Standard-Ligierungsansatz von 20 µl enthielt 50 ng Vektor-DNA, 20 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus), 1x T4-Ligase-Puffer, sowie entsprechende Mengen an Insert-DNA. Die Reaktion erfolgte entweder 1 h bei RT oder üN im Eisbad. Der Ansatz wurde anschliessend direkt zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt.

6.2.6.2 Ligierung der SamR2-Bibliothek

Die generierte SamR2-Bibliothek wurde in die entsprechenden Vektoren im molaren Verhältnis Vektor zu Insert von 1:2 ligiert. Der Ligierungsansatz von 20 µl enthielt 500ng Vektor-DNA, 20 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus), 1x T4-Ligase-Puffer, sowie entsprechende Mengen an Insert-DNA. Die Reaktion erfolgte üN im Eisbad. Der Ansatz wurde am nächsten Tag bei 65°C für 10 min hitzeinaktiviert und mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt. Durch das Entfernen von Salzen sollte die Effizienz in anschliessender Transformation elektrokompenter, frisch hergestellter TG1-Zellen erhöht werden.

6.2.6.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 ng bis 1 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis, in der die DNA an die Zellen adsorbiert, wurden die Proben für 1 min auf 42°C (Hitzeschock) erwärmt und anschliessend 2 min auf Eis gestellt. Der Reaktionsansatz wurde dann nach Zugabe von LB₀-Medium 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um eine Expression des Antibiotikaresistenzgens vom eingebrachten Plasmid zu ermöglichen. Um transformierte Einzelkolonien zu erhalten, wurde die Bakteriensuspension danach auf geeignete Selektionsplatten ausgestrichen und üN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

6.2.6.4 Elektroporation von TG1-Zellen

Bei der Elektroporation werden durch einen hohen Spannungs-Puls kurzzeitig Poren in der Bakterienhülle induziert. Exogene DNA kann durch diese Poren in das Bakterium eindringen. 50 µl elektrokompetene, frisch produzierte TG1-Zellen (6.4.1) wurden mit je 50 ng des Ligationsansatzes (6.2.6.2) in 10 parallelen Ansätzen versetzt. Zur Elektroporation (BioRad Genepulser, BioRad München) wurde die Suspension in auf Eis vorgekühlte Küvetten (Spaltbreite: 1 mm, Peqlab Erlangen) überführt. Nach dem Puls (1.25 kV, 25µF, 200 Ω) wurden die Bakterien sofort in 37°C warmes SOB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf SOBAG-Platten ausplattiert.

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Rekombinante Expression

Für die Expression von GST- bzw. GST-6xHis-Fusionsproteinen wurden die entsprechenden Konstrukte zunächst in das Expressionsplasmid pGEX-KG kloniert und anschliessend zur Transformation des *E. coli*-Stamms BL21(DE3) eingesetzt. Das zu exprimierende Fusionsgen, steht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors, welcher den *lac*-Operator reguliert wird. Die Transkription wird während des Bakterienwachstums durch den *lac*-Repressor verhindert, indem dieser an den *lac*-Operator bindet. Bindet der *lac*-Repressor an IPTG so erfährt dieser eine Konformationsänderung und dissoziiert vom Operator und vermittelt so die Synthese des Fusionsproteins.

Eine Einzelkolonie des jeweiligen Stammes wurde in 5ml Flüssigkultur (LB_{Amp}) verimpft und üN bei 37°C und 210 rpm geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurde ein entsprechendes Volumen in 400 ml LB_{Amp}-Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (210 rpm) bis zu einer O.D₆₀₀ von 0.6-0.8 (Adsorptionsmessung im Bio-Rad SmartSpec Plus Spectrophotometer, München) herangezogen. Die Proteinproduktion wurde mit 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) induziert und für 2 h bei 37°C durchgeführt.

Nach der Produktion der rekombinanten Fusionsproteine wurden die *E. coli*-Kulturen abzentrifugiert (15 min, 6000 g, 4°C). Im Anschluss folgte die Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine (6.3.2). Dabei wurden alle nachfolgenden Versuchsschritte auf Eis durchgeführt.

6.3.2 Affinitätschromatographie

6.3.2.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Nach Produktion des rekombinanten Proteins und anschließender Zentrifugation wurde das Pellet in 20 ml kaltem NETN-Puffer mit 1 mM PMSF (Serin-Proteaseinhibitor, Roche, Mannheim) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die durch langsames Auftauen in kaltem Wasser teilweise lysierten Bakterien wurden dann unter Zugabe von 1 mg/ml Lysozym für 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler (GFL® 3025, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) geschüttelt. Der vollständige Aufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung (5 min, 60 %, Cycle 5) mit einer Nadelschwingsonde (Ultraschall-Homogenisator Bandelin Sonoplus, Bandelin electronic, Berlin). Das Lysat wurde anschliessend zentrifugiert (60 min, 20000 g, 4°C), um unlösliche Proteinbestandteile und Zelltrümmer abzutrennen.

Anschliessend erfolgte die selektive Bindung der GST-Fusionsproteine im Proteinüberstand an die Affinitätsmatrix Glutathion-Sepharose® (Amersham Biosciences, Freiburg). Dabei entsteht ein Enzym-Substrat-Komplex zwischen Glutathion, das über eine Oxirangruppe an die Sepharose-Matrix gekoppelt ist, und dem Enzym Glutathion-S-Transferase (GST), welches eine Bindestelle für Glutathion besitzt. Somit wird das GST-Fusionsprotein reversibel an die Glutathion-Sepharose-Matrix gekoppelt. Für diesen Reinigungsschritt wurde eine Säule (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) zunächst mit 5 ml NETN-Puffer vorgespült. Anschliessend wurden 1.33 ml 75 %ige Glutathion-Sepharose auf die Säule gegeben. Um Alkoholreste zu entfernen, wurde das Säulenmaterial dreimal mit 5ml NETN-

Puffer gewaschen. Die Matrix wurde in 1-2 ml des löslichen Proteinüberstands resuspendiert und in ein 50 ml Falcon-Tube (Falcon, Heidelberg) zu dem restlichen Überstand des Bakterienlysats überführt. Die Bindung der Fusionsproteine an die Affinitätsmatrix erfolgte im Batch-Verfahren μ N bei 4°C auf einem Überkopfschüttler.

Die Ansätze wurden am nächsten Tag 10 min bei 500 g, RT abzentrifugiert. 15 ml des Überstands wurden verworfen, die Glutathion-Sepharose im restlichen Überstand resuspendiert und in die Säule überführt. Vor der Elution wurde die Matrix 3x mit jeweils 5 ml NETN-Puffer sowie 3x mit jeweils 5 ml GST-Waschpuffer gewaschen. Die Elution der rekombinanten GST-Fusionsproteine erfolgte in 3 Schritten durch Zugabe von je 1 ml GST-Elutionspuffer und anschließender Inkubation für 10 min. Das Säulenmaterial wurde nach der Elution mit 1 ml 20 % EtOH gewaschen, erneut mit 1 ml 20 % EtOH aufgefüllt und bei 4°C zur Wiederverwendung aufbewahrt.

Zur Dokumentation der Reinigung wurden bei allen Reinigungsschritten Aliquots entnommen und durch eine SDS-PAGE-Analyse mit Coomassie-Färbung analysiert.

6.3.2.2 Aufreinigung von GST-6xHis-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von GST-6xHis-Fusionsproteinen erfolgte zunächst nach dem Aufreinigungsprotokoll für GST-Fusionsproteine (6.3.2.1). Die Elutionsfraktionen wurden anschliessend 2x gegen je 1.8 l 6xHis-Lysepuffer dialysiert, gepoolt und der Aufreinigung von Polyhistidin-Fusionsproteinen über eine Ni-NTA-Agarose-Matrix unterzogen. Die Aufreinigungsprozedur von 6xHis-Fusionsproteinen beruht auf ionischen Wechselwirkungen. Vier der sechs Koordinationsstellen des Ni²⁺-Ions werden dabei von Nitrilotriessigsäure (NTA) besetzt, die wiederum an die Agarosematrix gebunden ist. Das 6xHis-Fusionsprotein bindet über jeweils zwei seiner sechs Histidinreste an die verbleibenden zwei Koordinationsstellen des Ni²⁺-Ions. Hierzu wurde zunächst die Säule, auf die dann 2 ml der Ni-NTA-Agaroselösung überführt wurden, mit je 5 ml 6xHis-Lysepuffer vorgespült. Die Matrix wurde in den gepoolten Elutionsfraktionen resuspendiert und in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Die Bindung der Fusionsproteine an die Agarosematrix erfolgte für 1 h bei RT auf einem Überkopfschüttler. Anschliessend wurde die Agarosematrix mit dem gebundenen Fusionsprotein auf die Säule überführt. Es folgte dreimaliges Waschen der Matrix mit je 5 ml 6xHis-Lysepuffer, sowie je 5 ml 6xHis-Waschpuffer. Die Elution des Fusionsproteins von der Affinitätsmatrix erfolgte mittels

kompetitiver Verdrängung durch Imidazol. Hierzu wurden 3x jeweils 1 ml des 6xHis-Elutionspuffers auf die Säule gegeben und 10 min inkubiert. Die Elution des Fusionsproteins verlief mit einer Flussrate von ca. 0.2 ml pro min. Die Ni-NTA-Matrix wurde danach mit 1 ml 20 % EtOH gewaschen, erneut mit 1 ml 20 % EtOH aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt. Zur Dokumentation der Reinigung wurden bei allen Reinigungsschritten Aliquots entnommen und durch eine SDS-PAGE-Analyse (6.3.4) mit Coomassie-Färbung analysiert.

6.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der aufgereinigten Fusionsproteine sowie die Proteinkonzentration von Zellysaten wurde mit dem „Bradford Protein Assay“ nach Angaben des Herstellers (Biorad, München) bestimmt. Nach Bindung des Farbstoffs „Coomassie Brilliant Blue G250“ kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm, die photometrisch registriert wird. Aus dem Vergleich der gemessenen Absorption mit den Werten einer BSA-Eichkurve lässt sich die Proteinmenge näherungsweise ermitteln.

6.3.4 SDS-PAGE

Bei der SDS (*sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren Eigenladungen so, dass alle Proteine annähernd ihrer Größe entsprechend zur Anode wandern. Die Proteine werden zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel aufkonzentriert, von welchem alle Polypeptide gemeinsam in das eigentliche Trenngel einlaufen.

Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen und das Gießen der Gele sind der Beschreibung des Geräteherstellers (Biometra, Göttingen) zu entnehmen. Die genaue Zusammensetzung der Gellösungen zum Gießen eines mittleren Gels (50 cm², 1 mm dick) ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

	Sammelgel 5 %ig	Trenngel 10 %ig	Trenngel 12.5 %ig	Trenngel 15 %ig
30 % Acrylamid- 0.8 % Bisacrylamid-Stammlösung	0.99 ml	6 ml	7.5 ml	9 ml
1.88 M Tris/HCl pH 8.8	-	3.6 ml	3.6 ml	3.6 ml
0.625 M Tris/HCl pH 6.8	1.2 ml	-	-	-

0.5 % SDS-Lösung	1.2 ml	3.6 ml	3.6 ml	3.6 ml
H ₂ O	2.61 ml	4.8 ml	3.3 ml	0.3 ml
N,N,N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	6 µl	15 µl	15 µl	15 µl
10 % Ammoniumpersulfatlösung (APS)	30 µl	90 µl	90 µl	90 µl

Pro Ansatz wurden 50 µg bis 100 µg Protein mit ¼ Volumen 5-fach oder 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und 5min bei 95°C denaturiert. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Precision Plus Protein Standard“ (BIORAD, München) oder der „Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte im SDS-PAGE-Laufpuffer bei 10 bis 20 mA.

Die Färbung von SDS-PA-Gelen erfolgte mit einer Coomassie-Färbelösung unter Schwenken für 20-30 min. Entfärbt wurde durch Inkubation üN mit der Entfärbelösung.

6.3.5 Western Blotting und Immunodetektion

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran („Immobilon NC pure“, Millipore, Bedford, USA) erfolgte in einer „Fast-Blot semidry“-Apparatur (Biometra, Göttingen) in Transferpuffer nach Angabe des Herstellers für 60 min bei einer konstanten Stromstärke von 1.5 mA/cm². Die denaturierten Proteine wandern, entsprechend ihrer nach SDS-Behandlung negativen Ladung, in Richtung Anode und werden durch hydrophobe Wechselwirkungen auf der Nitrozellulose immobilisiert.

Zur Überprüfung des erfolgten Proteintransfers und zur Markierung des Molekulargewichtsstandards wurden die Proteine reversibel mit Ponceau-S-Lösung angefärbt und anschliessend durch Waschen mit TTBS wieder entfärbt.

Die Absättigung freier und unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulose nach dem Proteintransfer erfolgte üN bei 4°C mit einer 5 %-igen Magermilch-Lösung in TBS. Nach dem Blockieren wurde die Membran 3x mit TTBS gewaschen, bevor sie 1 h mit einer entsprechenden Verdünnung eines primären Antikörpers (5.8) inkubiert wurde. Anschliessend wurde die Membran wiederum 3x mit TTBS gewaschen und 1h mit einem Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert (5.8). Die sekundären Antikörper besaßen entweder ein *horseradish peroxidase* (HRP)- oder ein Alkalisches Phosphatase-Konjugat. So konnte, nach dreimaligem Waschen mit TTBS, die Detektion der Antikörper-

Antigen-Komplexe auf der Membran entweder mit dem AP-Substrat oder über ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Detektion im Geldokumentationssystem Westernblot Imager ChemiLux Imager 2008 (Intas, Göttingen) oder im Falle der Alkalischen Phosphatase über einen Niederschlag nach Zugabe von NBT/BCIP (Roche, Mannheim) in AP-Färbepuffer erfolgen.

6.3.6 Pull down-Assay

Der *Pull down*-Assay ist eine *in vitro*-Methode zur Verifizierung direkter Interaktionen zwischen zwei Proteinen. Der Assay funktioniert nach dem Prinzip der Affinitätsaufreinigung und ähnelt sehr stark der Immunopräzipitation, wobei an Stelle von Antikörpern aufgereinigte Fusionsproteine verwendet werden.

Die Bindung der Proteine erfolgte an magnetische *Beads* (M-270 Epoxy *Dynabeads*, Invitrogen, Hamburg), die an ihrer Oberfläche reaktive Epoxy-Gruppen tragen. Durch nukleophile Substitution primärer Amino- und Sulfhydrylgruppen wird eine kovalente Bindung zwischen den *Beads* und dem jeweiligen Protein gebildet. Die *Beads* wurden zunächst in DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von $1 \cdot 10^9$ *Beads*/ml vorlagen, und wurden fortan auf Eis gelagert.

Am Vortag wurden 100 μ l *Beads* in einem 1.5 ml-Eppendorfgefäß zunächst 3x mit 100 μ l *Bead*-Puffer gewaschen. Dazu wurde das Eppendorfgefäß in einem Magnetständer (DYNAL Biotech GmbH, Hamburg) platziert, so dass die *Beads* am Rand konzentriert wurden und der *Bead*-Puffer quantitativ abgenommen werden konnte. Nach erneuter Pufferzugabe wurden die *Beads* durch Vortexen resuspendiert. Die Bindung der Proteine erfolgte in folgendem Ansatz: 60 μ g Protein ad 100 μ l mit *Bead*-Puffer und 50 μ l Ammoniumsulfatpuffer. Die Inkubation erfolgte üN bei 4°C in einem Überkopfschüttler. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und die *Beads* 3x mit 1 ml PBS gewaschen und anschliessend in 500 μ l Blockingpuffer für *Pull down*-Assay für 6 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert, um alle unbesetzten Bindestellen an den *Beads* abzusättigen. Danach folgte ein sechsmaliges Waschen der *Beads* mit jeweils 1 ml PBS. An die *Beads* gebundene Proteine wurden mit 500 μ l Zellysat (2.5 mg Gesamtprotein in RIPA) üN bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Dadurch konnte das Zielprotein seinen Bindepartner einfangen. Am nächsten Tag wurde das Zellysat abgenommen und die *Beads* 6x mit 1ml PBS gewaschen. Anschliessend wurden die Ansätze mit 50 μ l 2x SDS-Probenpuffer versetzt und

bei 95°C für 5 min aufgekocht. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE (6.3.4) und Western Blotting (6.3.5).

6.3.7 Co-Immunopräzipitation

Immunopräzipitationen eignen sich zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Diese Technik macht sich die Fähigkeit von Antikörpern zu Nutze, ihr Antigen spezifisch zu erkennen und zu binden. Dabei wird auch jedes zelluläre Protein, das mit dem Antigen interagiert, isoliert. Protein-A-Sepharose-Beads werden benutzt, um die Antigen-Antikörper Komplexe von anderen Proteinen zu trennen. Protein A ist ein Protein, welches auf der Oberfläche von *Staphylococcus aureus*-Zellen gefunden wurde und die Fähigkeit besitzt, den F_c-Teil von Antikörpern zu binden.

Für die Co-Immunopräzipitation wurde die benötigte Menge an Protein-A-Sepharose (Sigma, St. Louis, USA) mit IP-Puffer auf eine Endkonzentration von 30 mg/ml eingestellt, zum Quellen 30 min bei RT inkubiert und danach abzentrifugiert (5 min, 7697 g, RT). Das Pellet wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen in Blockingpuffer für Co-IP ad 30 mg/ml resuspendiert und 1 h bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde anschliessend insgesamt 3x gewaschen, indem es jeweils in 1 ml IP-Puffer resuspendiert, anschliessend abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde wieder in IP-Puffer ad 30 mg/ml resuspendiert. Die gequollene Protein-A-Sepharose ist eine Woche bei 4°C haltbar.

Pro Ansatz wurden 100 µl der Suspension (entsprechend 3 mg) in ein 1.5 ml-Eppendorfgefäß gegeben, mit 2 µg Antikörper versetzt und mit IP-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 1ml gebracht. Es folgte ein einstündiger Inkubationsschritt bei 4°C auf einem Überkopfschüttler. Der Ansatz wurde anschliessend abzentrifugiert, um nicht gebundene Antikörper mit dem Überstand abzunehmen. Im Pellet befanden sich die mit Antikörper beladenen Protein-A-Sepharose Beads. Das Pellet wurde insgesamt 3x gewaschen, indem es jeweils in 1 ml IP-Puffer resuspendiert, anschliessend abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Der Ansatz wurde dann mit 1 ml Antigen-Lösung (500 µg Gesamtprotein) üN bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag folgte eine Zentrifugation, um nicht gebundenes Antigen im Überstand abzutrennen. Das Pellet wurde fünfmal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen. Der an Protein-A-Sepharose gebundene Antigen-Antikörper Komplex wurde zuletzt je nach Bedarf in einem bestimmten

Volumen an 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Die Analyse erfolgte anschliessend durch SDS-PAGE und Western Blot (6.3.4 und 6.3.5).

6.3.8 p24-ELISA

Der p24-ELISA dient zur Quantifizierung des HIV-Capsid-Proteins p24 in Zellkulturüberständen. Hierzu wurden zunächst die Zellkulturüberstände zur Abtrennung von Zelltrümmern zentrifugiert (5 min, 300 g, RT), der Überstand zur Inaktivierung und Lyse der HI-viralen Partikel mit 1/10 Volumen Triton X-100 für 30 min inkubiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Zu Beginn wurden 96-well MaxiSorp-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) bei 4°C üN mit 100 µl einer 1:4000-Verdünnung des CA (p24)-spezifischen monoklonalen M01-Antikörpers in Coating-Puffer inkubiert. Für die Erstellung der Standardgeraden wurde ein p24-Standard seriell 1:2 verdünnt (5000–19.5 pg/ml). Die Zellkulturüberstände wurden in folgenden Verdünnungen 1:10, 1:100 bzw. 1:1000 eingesetzt. Die unterschiedlichen Verdünnungen wurden in dem Medium erstellt, das auch für die Kultivierung von 293T-Zellen Verwendung fand. Je 100 µl aller Verdünnungen wurden nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatten mit PBS/T aufgetragen und anschliessend 1 h bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden die Mikrotiterplatten 6x gewaschen und je 100 µl einer Verdünnung des biotinylierten 37G12-Antikörpers (1:10000 in PBS/1 % BSA) aufgetragen und eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Nach weiteren zehn Waschschritten wurde eine 1:10000 Mischung des Streptavidin-HRP-Konjugats (1:10000 in PBS/1 % BSA) zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Nach 10x Waschen mit TTBS wurden die Antikörperkonjugate mit 100 µl einer 1:1-Verdünnung TMB-Substratlösung detektiert. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl 1 N H₂SO₄ abgestoppt und die Adsorption mit einem Spektrophotometer (Biorad, Modell 680 Microplate Reader, München) bei 450 nm gemessen. Mit Hilfe der Standardgeraden konnte anschliessend die p24-Konzentration bestimmt werden.

6.4 Phagen-Display

6.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Vermehrung von Bakteriophagen wurde der *E. coli* K12 Stamm TG1 verwendet. Dieser besitzt die Fähigkeit, F-Pili (F-Plasmid) auszubilden und kann somit vom Bakteriophagen M13 infiziert werden. Durch Kultivierung auf M9-MM-Medium konnte auf das F-Plasmid

mit dem Auxotrophie-Marker *proAB*, der zur Synthese der Aminosäure Prolin nötig ist, selektioniert werden. Desweiteren kann dieser Suppressorstamm das Amber-Stopp-Codon (TAG) überlesen, da er eine entsprechende tRNA besitzt, welche für die Aminosäure Glutamin codiert.

Für die Herstellung elektrokompetenter TG1-Zellen wurden diese aus einer Vorkultur in M9-MM-Medium mit einer OD_{600} von 0.01 in LB₀-Medium angeimpft und bei 18°C bis zu einer OD_{600} von 0.2 bis 0.25 bei 220 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden anschliessend einem dreiminütigen Hitzeschock bei 37°C unterworfen, erneut bei 18°C für 20 min geschüttelt und im Eisbad abgekühlt. Die eiskalte Bakterien-Suspension wurde in 50 ml Falcon-Tubes (Falcon, Heidelberg) überführt und bei 4°C für 5 min bei 2000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 7 %iger (v/v) DMSO-Lösung aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschliessend wurde das Pellet 2x in 5 ml 7 % DMSO aufgenommen und abzentrifugiert. Zuletzt wurden die Bakterien in je 500 µl DMSO-Lösung aufgenommen und in 100 µl-Ansätze aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Bakterien auf Eis gelagert, wobei die Zeitspanne möglichst gering gehalten werden sollte. Um eine hohe Transformationseffizienz für die Herstellung einer Bibliothek zu erreichen, wurden die TG1-Zellen am Tag der Transformation hergestellt. Desweiteren wurde ein Teil der TG1-Zellen für Standard-Transformationen im flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Alle Arbeiten zur Herstellung elektrokompetenter TG1-Bakterien wurden im Kühlraum mit vorgekühlten Materialien und Reagenzien durchgeführt.

6.4.2 Produktion von Phagenüberständen

Zur Produktion von Phagenüberständen wurden 10ml YT-AG-Medium in einem 50ml Falcon-Tube aus einer Glycerinkultur oder einer Kolonie TG1-Zellen, in die das gewünschte Konstrukt transformiert worden war, angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bei 220rpm bis zu einer OD_{600} von 0.4 (frühe logarithmische Phase) inkubiert. Die TG1-Zellen wurden anschliessend mit 10^{10} cfu (*colony forming units*) des Helferphagen M13K07 (GE Healthcare, München) oder des Hyperphagen (Progen, Heidelberg) infiziert und weitere 30min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte durch Mediumwechsel eine zusätzliche Selektion auf den Helferphagen und das Phagmid. Hierzu wurden die Bakterien gewaschen (Zentrifugation bei 5500 g, 10 min, RT, Resuspendierung des Pellets in 5 ml YT-AK), pelletiert (5500 g, 10 min, RT) und in 10 ml YT-AK aufgenommen. Die Produktion der

Phagenüberstände erfolgte bei 30°C üN für Einzelphagenüberstände bzw. für 5 h bei Phagengemischen, um zu verhindern, dass einzelne Phagen aufgrund eines Selektionsvorteils überproportional häufig vertreten sind. Anschliessend wurden die Phagenüberstände bei 5500 g für 10 min pelletiert, durch einen 0.45 µm-Filter sterilfiltriert und bei 4°C zur direkten Weiterverwendung gelagert oder bei -20°C eingefroren.

6.4.3 Titration

Die Titration der Phagenüberstände konnte auf LB_{Amp}-Platten durchgeführt werden, da M13 kein lysogener Phage ist und dieser während der Infektion die Ampicillin-Resistenz des Phagemids erwirbt. Somit können infizierte Bakterien auf LB_{Amp}-Platten zu Kolonien heranwachsen. Der infektiöse Titer von M13-Phagen-Überständen kann daher als „Koloniebildende Einheiten pro ml“ (*colony forming units/ml* = cfu/ml) angegeben werden.

Zur Titerbestimmung wurden TG1-Zellen aus einer M9-MM-Vorkultur in LB₀-Medium überimpft, bei 37°C unter Schütteln bei 220rpm bis zu einer optischen Dichte von 0.4 bis 0.5 inkubiert und dann auf Eis maximal drei Tage gelagert. Bei jeder Titerbestimmung wurde stets ein Referenzphage zur Normierung (willkürlich gewählter Phagenüberstand mit der Bezeichnung „p6-9“, Titer eingestellt auf 1x10¹² cfu/ml) mitgeführt. Die Phagenüberstände wurden seriell in LB₀-Medium verdünnt (Verdünnungen 1:10⁴ bis 1:10⁷) und je 4 µl davon zu 200µl TG1-Zellen gegeben, die zuvor für 10 min bei 37°C inkubiert worden waren. Die Infektion erfolgte für 30min bei 30°C ohne Schütteln. Anschliessend wurden je 50 µl der Bakterien-Phagen-Suspension auf SOBAG-Platten ausplattiert und üN bei 30°C bebrütet. Der Titer errechnete sich nach folgender Formel:

Titer (cfu/ml) = Zahl der Kolonien x Verdünnungsfaktor x Korrekturfaktor / 0.004 ml

Der Korrekturfaktor errechnete sich wie folgt:

Titer (cfu/ml) = [Titer (Phagen-Überstand X) / Titer (Phagen-Überstand p6-9)] x 10¹²

Die Titerbestimmung wurde in parallelen Ansätzen in Duplikaten durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

6.4.4 PEG-Fällung

Zur Aufkonzentrierung der Phagenüberstände wurden diese mit 1/5 Volumen einer PEG/NaCl-Lösung vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die Ansätze 10min bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das

Pellet in 5-fachen SDS-Probenpuffer für eine anschließende SDS-PAGE mit Western Blotting aufgenommen.

6.4.5 Bio-Panning

Das Bio-Panning wurde zur Selektion hochaffiner SamR2 Varianten eingesetzt. Hierfür wurde das rekombinant hergestellte Zielprotein GST-Rev an magnetische *Dynabeads* (M-270 Epoxy *Dynabeads*, Invitrogen, Hamburg) gebunden und mit der SamR2-Phagenbibliothek inkubiert. Gebundene Phagen wurden nach intensivem Waschen durch einen pH-Sprung von den *Dynabeads* eluiert und zur Infektion und Amplifikation mit TG1-Zellen inkubiert. Hochaffine Varianten wurden durch DNA-Isolierung und Sequenzierung bestimmt.

Das Bio-Panning gliederte sich in drei Phasen: Coaten der *Dynabeads*, Phagenselektion, Re-Amplifizierung.

1. Coaten der *Dynabeads*:

100 µl Bead-Lösung wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in einem Magnetständer (Dynal Biotech GmbH, Hamburg) platziert, so dass der Überstand abgenommen werden konnte. Nach dreimaligem Waschen mit *Bead*-Puffer wurden 10 µg Protein in insgesamt 100 µl *Bead*-Puffer zu den *Dynabeads* gegeben und 50 µl einer Ammoniumsulfatlösung zugesetzt. Der Ansatz wurde üN auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert.

2. Panning:

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die *Beads* 1 h bei RT mit 100 µl Blockingpuffer geschüttelt. Zugleich wurde die Phagenbibliothek oder der Phagen-Überstand aus einer früheren Runde (Titer > 10⁹ cfu/ml) 1:1 mit Blockingpuffer gemischt und 15 min bei RT geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Überstand im Magnetständer wieder abgenommen, die *Beads* 3x mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen und mit der PhagenVerdünnung 1 h unter Schütteln inkubiert. 10 µl der PhagenVerdünnung wurden für eine Titerbestimmung (Aliquot #1) abgenommen, der Rest wurde verworfen. Zum Entfernen der unspezifisch oder schwach gebundenen Phagen wurden die *Beads* 10x mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen pH-Sprung auf 2.2 mit 100 µl Elutionspuffer bei RT für 10 min unter Schütteln. Die Phagenlösung wurde anschliessend im Magnetständer abgenommen und durch Zugabe von 30 µl 1 M Tris-HCl

pH 9.0 neutralisiert. Anschliessend wurde ein 10 μ l-Aliquot für eine Titerbestimmung (Aliquot #2) abgenommen.

3. Re-Amplifizierung:

Der selektionierte Phagenüberstand wurde zu 3 ml frischen TG1-Zellen OD₆₀₀ 0.4 in ein 50 ml-Falcon-Tube gegeben (6.4.3). Die Infektion fand unter Schütteln bei 37°C für 45 min statt. Dann wurde eine Probe von 100 μ l (Aliquot #3) entnommen; die restlichen infizierten TG1-Zellen wurden auf großen SOBAG-Platten ausplattiert und \ddot{u} N bei 30°C bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Kolonien mit YT-AG-Medium von den Platten abgeschwemmt, auf eine OD₆₀₀ von 0.4 eingestellt und die Phagenüberstände produziert (6.4.2).

Analyse:

Die produzierten Phagenüberstände wurden zur Qualitätskontrolle anschliessend titriert (6.4.3) und in eine neue Runde eingesetzt. Zur quantitativen Analyse des Bio-Pannings wurden ebenfalls die abgenommenen Phagenüberstände Aliquot #1-3 titriert. Hochaffine Varianten wurden aus einer Anzahl von Kolonien der SOBAG-Platten nach der Amplifikation durch DNA-Isolierung und Sequenzierung analysiert.

6.4.6 Phagen-ELISA

Die Affinität der amplifizierten Phagenüberstände aus den Panning-Runden sowie der einzelnen Varianten wurde mit einem Phagen-ELISA untersucht. Zur Auswertung wurde das Modell für eine Protein-Protein-Interaktion in Analogie zur Michaelis-Menten-Kinetik verwendet. Hierbei wird die Absorption (Menge gebundener Phagen) gegen den Titer in cfu/ml aufgetragen und ergibt eine typische Sättigungskurve bzw. bei halblogarithmischer Auftragung eine sigmoide Kurve.

Hierzu wurden 2 μ g Protein (rekombinant hergestelltes GST-Rev) in 100 μ l Coating-Puffer in jedes *well* einer 96-well MaxiSorp-Mikrotiterplatte gegeben und diese \ddot{u} N bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte 3x mit PBS/T gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation mit je 200 μ l *Blocking*-Puffer pro *well* für 2 h bei RT abgesättigt. Nach Entfernen des Puffers und drei weiteren Waschsritten wurden in parallelen Ansätzen je 100 μ l einer Verdünnungsreihe der Phagenüberstände (1:4er-Schritte, in LB₀-Medium) beginnend bei 10¹² cfu/ml über 12 Stufen zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden überschüssige Phagen durch fünfmaliges Waschen entfernt. Anschliessend wurden je 100 μ l eines 1:5000 in *Blocking*-Puffer verdünnten HRP-gekoppelten Anti-M13-

Antikörpers für 1 h zugegeben. Nach zehnmaligem Waschen wurden pro *well* 100 µl TMB-Substrat-Lösung zugegeben. Das Enzym HRP setzt das TMB-Substrat zu einem blauen Farbstoff um. Durch Zugabe von 50 µl 1N Schwefelsäure wurde die Reaktion abgestoppt, wodurch der Farbstoff nach gelb umschlägt. Die Absorption wurde mit einem Spektrophotometer (Biorad, Modell 680 Microplate Reader, München) bei 450 nm gemessen.

6.5 Zellbiologische Methoden

6.5.1 Transiente Transfektion

293T-Zellen lassen sich effizient mit dem Transfektionsreagenz PEI (25 kDa, Polysciences, Eppelheim) transfizieren. Polyethylenimine (PEIs) sind kationische Polymere mit der Fähigkeit Nukleinsäuren in positiv geladene Partikel zu komplexieren, welche nachfolgend mit der anionischen Zelloberfläche interagieren und über Endozytose aufgenommen werden. Aufgrund der hohen Ladungsdichte des Polymers wird die DNA aus den Lysosomen ins Cytosol freigesetzt und kann in den Zellkern wandern. Hierzu wurden am Vortag 293T-Zellen in entsprechenden Kulturgefäßen ausgesät und für 24h inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte kurz vor der Transfektion ein Mediumwechsel auf DMEM ohne Zusätze. Für die Transfektion der Zellen wurde ebenfalls DMEM-Medium ohne jegliche Zusätze vorgelegt, die DNA und PEI in einem Verhältnis von 1:4 zugegeben und der Ansatz gründlich gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde der Transfektionsansatz gleichmäßig auf die Zellen gegeben. Anschliessend wurden die Zellen zunächst für 4-6 h und nach erneutem Wechsel des Mediums auf DMEM mit Zusätzen, für insgesamt 48 h im Brutschrank kultiviert.

Die unten dargestellte Tabelle zeigt die jeweilige Zellzahl und transfizierte Menge an Gesamt-DNA für unterschiedliche Kulturgefäße.

Kulturgefäß	Zellzahl	Menge DNA (µg)
6-well	4x10 ⁵	2
10 cm-Petrischale	1.5x10 ⁶	10
15 cm-Petrischale	7.0x10 ⁶	30

6.5.2 Zelllysate

Zur Analyse der transienten Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen wurden die konfluenten Zellen mit PBS gewaschen und anschliessend quantitativ von der Oberfläche des Gefäßes durch Spülen mit PBS gelöst. Nach Zentrifugation bei 300g für 5min und zweimaligem Waschen mit 1 ml eiskaltem PBS wurde das Zellsediment zur Proteinanalyse je nach Grösse des Zellpellets in 100 bis 500 µl kaltem RIPA-Puffer oder für Co-Immunopräzipitationen im Co-IP Puffer resuspendiert, wobei diese zuvor mit einem Proteaseinhibitor („Complete Mini“, Roche, Mannheim) Cocktail versetzt wurden, und für 5min im Bioruptor mit Ultraschall (Bioruptor Diagenode UCD-200, Einstellung "High" (320 W), 30 s Puls/Pause) lysiert. Unlösliche Komponenten wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 20800 g bei 4°C abgetrennt.

6.5.3 FACS- und FRET-Analyse

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln mit einem Laser bestrahlt und hinsichtlich ihrer Grösse und Granularität charakterisiert. Zugleich werden Fluoreszenzmoleküle angeregt, deren Emission bei geeigneter Wahl der Filter und Kompensation detektiert wird.

Sowohl für FACS- als auch FRET-Analysen wurden Zellen 48h nach der Transfektion im *6-well* geerntet. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und mit 0.5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung für 2min bei RT inkubiert, um diese von der *6-well* Oberfläche abzulösen. Die Zellen wurden anschliessend mit 1 ml FACS-Puffer versetzt, in FACS-Röhrchen überführt und bei 300 g 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 0.5 ml FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

Die Analysen wurden mit dem Durchflusszytometer FACS-Canto II von Becton Dickinson durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der „FACSDiva Software“. Die Population lebender Einzelzellen wurde in einer Auftragung der Zellgrösse gegen die Granularität (*forward/side-scatter* = FSC/SSC-Plot) dargestellt. Zur Messung der Anzahl positiver Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensität wurden Auftragungen des jeweiligen Fluorochroms gegen die Zellgrösse gewählt. Die Basislinie wurde so gelegt, dass die Anzahl positiver Zellen bei untransfizierten Zellen 0 betrug; es wurden 10000 Zellen pro Ansatz analysiert.

Sowohl die Maxima der Exzitation als auch die Emission der verschiedenen Fluorochrome sind in der unten dargestellten Tabelle gezeigt.

Fluorochrom	Exzitationsmaximum	Emissionmaximum	verwendeter Filter
GFP	488 nm	507 nm	530/30 nm
CFP	433 nm	475 nm	450/50 nm
YFP	513 nm	527 nm	530/30 nm

Die FRET-Analysen dienen der Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen. Befinden sich zwei geeignete Fluorophore in räumlicher Nähe (Abstand <10 nm), so findet ein Resonanz-Energietransfer (FRET) statt. Dabei überträgt ein Donor-Fluorophor nach Anregung einen Teil seiner Energie aufgrund des FRET-Effekts an sein Akzeptor-Fluorophor, welches die Energie anschliessend als Licht emittiert. Für die Analysen wurde das FRET-Donor/Akzeptor-Paar CFP (cyanfluoreszierend) und YFP (gelbfluoreszierend) gewählt. Die zu untersuchenden Proteine wurden entweder als CFP- oder YFP-Fusionsproteine exprimiert.

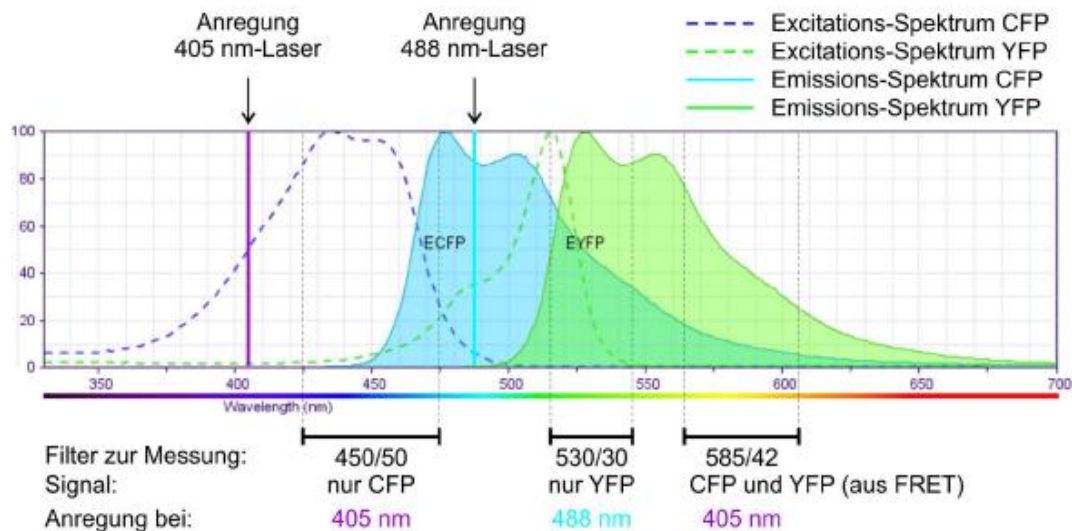


Abb. 6.1: Spektrale Eigenschaften von CFP und YFP sowie Parameter zur FACS-Messung.

Bei Anregung mit dem 405nm-Laser wird im 450/50-Filter die Intensität der CFP-Emission und im 585/42-Filter die Intensität des FRET-Signals gemessen. Mit dem 488 nm-Laser wird nur YFP angeregt, dessen Intensität im 530/30-Filter gemessen wird. (Die Spektren wurden mit dem „Fluorescence Spectrum Viewer“ von BD Biosciences erstellt).

Die FRET-Messung erfolgte durch Anregung von CFP mit Licht der Wellenlänge 405 nm, dessen Emission im Bandpass-Filter 450/50 gemessen werden kann. Zugleich wird die Fluoreszenzintensität im Filter 585/42 gemessen. In diesem Bereich wird ebenfalls CFP gemessen, zusätzlich auch ggf. YFP, das aber nur durch Resonanz-Energie-Transfer angeregt werden kann. Bei einem FRET-Effekt nimmt das Signal des Donors CFP im 450/50-Filter ab

und das Signal des Akzeptors YFP im 585/42-Filter entsprechend zu. Das Fluoreszenzsignal von YFP wird nach Anregung mit dem 488 nm-Laser zur Kontrolle im 530/30-Filter gemessen. So konnte neben dem FRET-Signal gleichzeitig die Expression der CFP-/ YFP-Fusionsproteine nachgewiesen werden

6.5.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden 293T-Zellen auf Deckgläschen in 6-wells ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Nach 48 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 1 ml PBS gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen durch fünfzehnminütige Inkubation mit 1 ml einer Fixierlösung auf den Deckgläschen fixiert und 3x mit 2 ml PBS/T gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml einer 0.1 % Triton X-100 Lösung für 15 min wurde die Zellwand permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS/T wurden die Zellkerne mit 1 ml einer DAPI-Färbelösung für 15 min angefärbt. Die Zellen wurden wieder 3x gewaschen und in einem letzten Schritt mit dest. Wasser gespült. Die gefärbten Zellen wurden nun mit 20 µl Eindeckmedium auf Objektträgern fixiert und üN bei RT getrocknet.

Die Analyse der Präparate erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRX, Bildaufnahme: CCD-Kamera Retiga-SRV, QImaging Bildverarbeitung: ImagePro 6.2-Software, MediaCybernetics) bei 630-facher Vergrößerung.

6.5.5 HIV-Replikations-Assay

Der HIV-Replikations-Assay gibt Aufschluss über den Einfluss exprimierter Proteine auf die Produktion viraler Partikel. Wird der Replikationszyklus in irgendeiner Weise durch diese Proteine beeinträchtigt, so spiegelt sich das in einer veränderten Virusproduktion wieder. Man kann aber nicht daraus schlussfolgern, welcher Schritt der Replikation beeinflusst wird. Für den Assay wurden entsprechende Konstrukte mit proviraler DNA pNL4-3 in 293T-Zellen co-transfiziert (6.5.1). 6 h Stunden danach wurde der Überstand abgesaugt, um die Transfektionsreagenzien zu entfernen, und frisches Medium mit Zusätzen zugegeben. 48 h nach Transfektion wurde die p24-Menge im Überstand nach Inaktivierung mit Triton X-100 als Maß für die Menge an produzierten Viruspartikeln im p24-ELISA quantifiziert (6.3.8). Für den Nachweis der Proteinproduktion wurden Zelllysate der transfizierten Zellen geerntet und im Western Blot analysiert (6.3.5 und 6.5.2).

7. Literaturverzeichnis

1. Gallo,R.C., Sarin,P.S., Gelmann,E.P., Robert-Guroff,M., Richardson,E., Kalyanaraman,V.S., Mann,D., Sidhu,G.D., Stahl,R.E., Zolla-Pazner,S. *et al.* (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 865-867.
2. Barre-Sinoussi,F., Chermann,J.C., Rey,F., Nugeyre,M.T., Chamaret,S., Gruest,J., Dauguet,C., Axler-Blin,C., Vezinet-Brun,F., Rouzioux,C. *et al.* (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.
3. Coffin,J., Haase,A., Levy,J.A., Montagnier,L., Oroszlan,S., Teich,N., Temin,H., Toyoshima,K., Varmus,H., Vogt,P. *et al.* (1986) What to call the AIDS virus? *Nature*, **321**, 10.
4. http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2010/20101123_globalreport_en.pdf. 2011.
5. Vaishnav,Y.N. and Wong-Staal,F. (1991) The biochemistry of AIDS. *Annu.Rev.Biochem.*, **60**, 577-630.
6. <http://www.landesbioscience.com/curie/images/chapters/Freed2.jpg>. 2011.
7. Cullen,B.R. (1991) Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB J.*, **5**, 2361-2368.
8. Susanne Modrow, Dietrich Falke., Uwe Truyen and Hermann Schätzl. *Molekulare Virologie*. 2010.
9. Dalgleish,A.G., Beverley,P.C., Clapham,P.R., Crawford,D.H., Greaves,M.F. and Weiss,R.A. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, **312**, 763-767.
10. Freed,E.O. (2001) HIV-1 replication. *Somat.Cell Mol.Genet.*, **26**, 13-33.
11. O'Brien,W.A., Koyanagi,Y., Namazie,A., Zhao,J.Q., Diagne,A., Idler,K., Zack,J.A. and Chen,I.S. (1990) HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature*, **348**, 69-73.
12. Doms,R.W. and Peiper,S.C. (1997) Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology*, **235**, 179-190.
13. Clapham,P.R. and Weiss,R.A. (1997) Immunodeficiency viruses. Spoil for choice of co-receptors. *Nature*, **388**, 230-231.
14. Deng,H., Liu,R., Ellmeier,W., Choe,S., Unutmaz,D., Burkhart,M., Di Marzio,P., Marmon,S., Sutton,R.E., Hill,C.M. *et al.* (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, **381**, 661-666.
15. 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.
16. Chan,D.C., Fass,D., Berger,J.M. and Kim,P.S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, **89**, 263-273.
17. Weissenhorn,W., Dessen,A., Harrison,S.C., Skehel,J.J. and Wiley,D.C. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, **387**, 426-430.
18. Karageorgos,L., Li,P. and Burrell,C. (1993) Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, **9**, 817-823.
19. McDonald,D., Vodicka,M.A., Lucero,G., Svitkina,T.M., Borisy,G.G., Emerman,M. and Hope,T.J. (2002) Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J.Cell Biol.*, **159**, 441-452.
20. Miller,M.D., Farnet,C.M. and Bushman,F.D. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J.Virol.*, **71**, 5382-5390.
21. Bukrinsky,M.I., Sharova,N., Dempsey,M.P., Stanwick,T.L., Bukrinskaya,A.G., Haggerty,S. and Stevenson,M. (1992) Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89**, 6580-6584.
22. Fujiwara,T. and Mizuuchi,K. (1988) Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell*, **54**, 497-504.
23. Berkhout,B., Silverman,R.H. and Jeang,K.T. (1989) Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell*, **59**, 273-282.
24. Dayton,A.I., Sodroski,J.G., Rosen,C.A., Goh,W.C. and Haseltine,W.A. (1986) The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell*, **44**, 941-947.
25. Fisher,A.G., Feinberg,M.B., Josephs,S.F., Harper,M.E., Marselle,L.M., Reyes,G., Gonda,M.A., Aldovini,A., Debouk,C., Gallo,R.C. *et al.* (1986) The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature*, **320**, 367-371.
26. Wei,P., Garber,M.E., Fang,S.M., Fischer,W.H. and Jones,K.A. (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, **92**, 451-462.
27. Freed,E.O. (2004) HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends Microbiol.*, **12**, 170-177.
28. Ensoli,B., Buonaguro,L., Barillari,G., Fiorelli,V., Gendelman,R., Morgan,R.A., Wingfield,P. and Gallo,R.C. (1993) Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J.Virol.*, **67**, 277-287.
29. Watson,K. and Edwards,R.J. (1999) HIV-1-transactivating (Tat) protein: both a target and a tool in therapeutic approaches. *Biochem.Pharmacol.*, **58**, 1521-1528.
30. Li,C.J., Wang,C., Friedman,D.J. and Pardee,A.B. (1995) Reciprocal modulations between p53 and Tat of human immunodeficiency virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **92**, 5461-5464.
31. Secchiero,P., Zella,D., Capitani,S., Gallo,R.C. and Zauli,G. (1999) Extracellular HIV-1 tat protein up-regulates the expression of surface CXC-chemokine receptor 4 in resting CD4+ T cells. *J.Immunol.*, **162**, 2427-2431.
32. Zauli,G., Gibellini,D., Caputo,A., Bassini,A., Negrini,M., Monne,M., Mazzoni,M. and Capitani,S. (1995) The human immunodeficiency virus type-1 Tat protein upregulates Bcl-2 gene expression in Jurkat T-cell lines and primary peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, **86**, 3823-3834.
33. Pollard,V.W. and Malim,M.H. (1998) The HIV-1 Rev protein. *Annu.Rev.Microbiol.*, **52**, 491-532.
34. Dewar,R.L., Natarajan,V., Vasudevachari,M.B. and Salzman,N.P. (1989) Synthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins

- encoded by a recombinant human adenovirus. *J.Virol.*, **63**, 129-136.
35. Freed,E.O. (1998) HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*, **251**, 1-15.
36. Henderson,L.E., Bowers,M.A., Sowder,R.C., Serabyn,S.A., Johnson,D.G., Bess,J.W., Jr., Arthur,L.O., Bryant,D.K. and Fenselau,C. (1992) Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J.Virol.*, **66**, 1856-1865.
37. Shao,W., Everitt,L., Manchester,M., Loeb,D.D., Hutchison,C.A., III and Swanstrom,R. (1997) Sequence requirements of the HIV-1 protease flap region determined by saturation mutagenesis and kinetic analysis of flap mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **94**, 2243-2248.
38. Gomez,C. and Hope,T.J. (2005) The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol.*, **7**, 621-626.
39. Adamson,C.S. and Jones,I.M. (2004) The molecular basis of HIV capsid assembly--five years of progress. *Rev.Med.Virol.*, **14**, 107-121.
40. Berkowitz,R., Fisher,J. and Goff,S.P. (1996) RNA packaging. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, **214**, 177-218.
41. Schwartz,M.D., Fiore,D. and Panganiban,A.T. (1997) Distinct functions and requirements for the Cys-His boxes of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein during RNA encapsidation and replication. *J.Virol.*, **71**, 9295-9305.
42. Emerman,M. (1996) HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Curr.Biol.*, **6**, 1096-1103.
43. Gallay,P., Stitt,V., Mundy,C., Oettinger,M. and Trono,D. (1996) Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J.Virol.*, **70**, 1027-1032.
44. He,J., Choe,S., Walker,R., Di Marzio,P., Morgan,D.O. and Landau,N.R. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J.Virol.*, **69**, 6705-6711.
45. Das,S.R. and Jameel,S. (2005) Biology of the HIV Nef protein. *Indian J.Med.Res.*, **121**, 315-332.
46. Aiken,C., Konner,J., Landau,N.R., Lenburg,M.E. and Trono,D. (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*, **76**, 853-864.
47. Lama,J. (2003) The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. *Curr.HIV.Res.*, **1**, 167-184.
48. Ploegh,H.L. (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science*, **280**, 248-253.
49. Sloan,R.D., Kuhl,B.D., Donahue,D.A., Roland,A., Bar-Magen,T. and Wainberg,M.A. (2011) Transcription of preintegrated HIV-1 cDNA modulates cell surface expression of MHC-I via Nef. *J.Virol.*
50. Stevenson,M. (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nat.Med.*, **9**, 853-860.
51. Stumptner-Cuvelette,P., Morchoisne,S., Dugast,M., Le Gall,S., Raposo,G., Schwartz,O. and Benaroch,P. (2001) HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **98**, 12144-12149.
52. Swigut,T., Shohdy,N. and Skowronski,J. (2001) Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J.*, **20**, 1593-1604.
53. Louis,J.M., Clore,G.M. and Gronenborn,A.M. (1999) Autoprocessing of HIV-1 protease is tightly coupled to protein folding. *Nat.Struct.Biol.*, **6**, 868-875.
54. Wagner,R., Fließbach,H., Wanner,G., Motz,M., Niedrig,M., Deby,G., von Brunn,A. and Wolf,H. (1992) Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch.Virol.*, **127**, 117-137.
55. Kaplan,A.H., Manchester,M. and Swanstrom,R. (1994) The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J.Virol.*, **68**, 6782-6786.
56. Cullen,B.R. (1992) Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol.Rev.*, **56**, 375-394.
57. Fouts,D.E., True,H.L., Cengel,K.A. and Celandier,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.
58. Malim,M.H., Hauber,J., Le,S.Y., Maizel,J.V. and Cullen,B.R. (1989) The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, **338**, 254-257.
59. Meyer,B.E. and Malim,M.H. (1994) The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.*, **8**, 1538-1547.
60. 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89**, 758-762.
61. Elfgang,C., Rosorius,O., Hofer,L., Jaksche,H., Hauber,J. and Bevec,D. (1999) Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**, 6229-6234.
62. Heaphy,S., Finch,J.T., Gait,M.J., Karn,J. and Singh,M. (1991) Human immunodeficiency virus type 1 regulator of virion expression, rev, forms nucleoprotein filaments after binding to a purine-rich "bubble" located within the rev-responsive region of viral mRNAs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **88**, 7366-7370.
63. 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.
64. Cullen,B.R. (1998) Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology*, **249**, 203-210.
65. Truant,R. and Cullen,B.R. (1999) The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 1210-1217.
66. Groom,H.C., Anderson,E.C. and Lever,A.M. (2009) Rev: beyond nuclear export. *J.Gen.Virol.*, **90**, 1303-1318.
67. Blissenbach,M., Grewe,B., Hoffmann,B., Brandt,S. and Uberla,K. (2010) Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 Rev revisited. *J.Virol.*, **84**, 6598-6604.
68. 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.Pathog.*, **3**, e54.
69. Grewe,B. and Uberla,K. (2010) The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: menage a trois during the early phase of the lentiviral replication cycle. *J.Gen.Virol.*, **91**, 1893-1897.
70. Levin,A., Hayouka,Z., Brack-Werner,R., Volsky,D.J., Friedler,A. and Loyter,A. (2009) Novel regulation of HIV-1 replication and pathogenicity: Rev inhibition of integration. *Protein Eng Des Sel*, **22**, 753-763.
71. Levin,A., Rosenbluh,J., Hayouka,Z., Friedler,A. and Loyter,A. (2010) Integration of HIV-1 DNA is regulated by interplay between viral rev and cellular LEDGF/p75 proteins. *Mol.Med.*, **16**, 34-44.
72. Rosenbluh,J., Hayouka,Z., Loya,S., Levin,A., Armon-Omer,A., Britan,E., Hizi,A., Kotler,M., Friedler,A. and Loyter,A. (2007) Interaction between HIV-1 Rev and integrase proteins: a basis for the development of anti-HIV peptides. *J.Biol.Chem.*, **282**, 15743-15753.
73. Engelman,A. and Cherepanov,P. (2008) The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS.Pathog.*, **4**, e1000046.
74. Thomas,S.L., Hauber,J. and Casari,G. (1997) Probing the structure of the HIV-1 Rev trans-activator protein by functional analysis. *Protein Eng*, **10**, 103-107.
75. Kjems,J., Frankel,A.D. and Sharp,P.A. (1991) Specific regulation of mRNA splicing in vitro by a peptide from HIV-1 Rev. *Cell*, **67**, 169-178.
76. 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.
77. Mann,D.A., Mikaelian,I., Zimmel,R.W., Green,S.M., Lowe,A.D., Kimura,T., Singh,M., Butler,P.J., Gait,M.J. and Karn,J. (1994) A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *J.Mol.Biol.*, **241**, 193-207.
78. Olsen,H.S., Cochrane,A.W., Dillon,P.J., Nalin,C.M. and Rosen,C.A. (1990) Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. *Genes Dev.*, **4**, 1357-1364.
79. 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. *J.Virol.*, **65**, 2131-2134.
80. Malim,M.H., Bohnlein,S., Hauber,J. and Cullen,B.R. (1989) Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell*, **58**, 205-214.
81. Thomas,S.L., Oft,M., Jaksche,H., Casari,G., Heger,P., Dobrovnik,M., Bevec,D. and Hauber,J. (1998) Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *J.Virol.*, **72**, 2935-2944.
82. Kjems,J., Brown,M., Chang,D.D. and Sharp,P.A. (1991) Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **88**, 683-687.
83. 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **88**, 7734-7738.
84. Zimmel,R.W., Kelley,A.C., Karn,J. and Butler,P.J. (1996) Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element. *J.Mol.Biol.*, **258**, 763-777.
85. Daugherty,M.D., Booth,D.S., Jayaraman,B., Cheng,Y. and Frankel,A.D. (2010) HIV Rev response element (RRE) directs assembly of the Rev homooligomer into discrete asymmetric complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **107**, 12481-12486.
86. 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.
87. Hope,T.J., Bond,B.L., McDonald,D., Klein,N.P. and Parslow,T.G. (1991) Effector domains of human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex are functionally interchangeable and share an essential peptide motif. *J.Virol.*, **65**, 6001-6007.
88. Malim,M.H., McCarn,D.F., Tiley,L.S. and Cullen,B.R. (1991) Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J.Virol.*, **65**, 4248-4254.
89. Kjems,J., Calnan,B.J., Frankel,A.D. and Sharp,P.A. (1992) Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev. *EMBO J.*, **11**, 1119-1129.
90. Bevec,D., Jaksche,H., Oft,M., Wohl,T., Himmelspach,M., Pacher,A., Schebesta,M., Koettnitz,K., Dobrovnik,M., Csonga,R. *et al.* (1996) Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science*, **271**, 1858-1860.
91. Katahira,J., Ishizaki,T., Sakai,H., Adachi,A., Yamamoto,K. and Shida,H. (1995) Effects of translation initiation factor eIF-5A on the functioning of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus Rev inhibited trans dominantly by a Rex mutant deficient in RNA binding. *J.Virol.*, **69**, 3125-3133.
92. Ruhl,M., Himmelspach,M., Bahr,G.M., Hammerschmid,F., Jaksche,H., Wolff,B., Aschauer,H., Farrington,G.K., Probst,H., Bevec,D. *et al.* (1993) Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J.Cell Biol.*, **123**, 1309-1320.
93. Campbell,L.H., Borg,K.T., Haines,J.K., Moon,R.T., Schoenberg,D.R. and Arrigo,S.J. (1994) Human immunodeficiency virus type 1 Rev is required in vivo for binding of poly(A)-binding protein to Rev-dependent RNAs. *J.Virol.*, **68**, 5433-5438.
94. Li,J., Tang,H., 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**, 709-714.
95. Kaminski,R., Darbinian,N., Sawaya,B.E., Slonina,D., Amini,S., Johnson,E.M., Rappaport,J., Khalili,K. and Darbinian,A. (2008) Puralpha as a cellular co-factor of Rev/RRE-mediated expression of HIV-1 intron-containing mRNA. *J.Cell Biochem.*, **103**, 1231-1245.
96. 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.
97. 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.
98. Sanchez-Velaz,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 Dev.*, **18**, 23-34.
99. Yedavalli,V.S., Neuveut,C., Chi,Y.H., Kleiman,L. and Jeang,K.T. (2004) Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell*, **119**, 381-392.
100. Yu,Z., Sanchez-Velaz,N., Catrina,I.E., Kittler,E.L., Udofia,E.B. and Zapp,M.L. (2005) The cellular HIV-1 Rev cofactor hRIP is required for viral replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **102**, 4027-4032.
101. 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 Å resolution for multimeric binding to the Rev response element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **107**, 5810-5814.
102. 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.
103. 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.
104. Stahl,S.J., Watts,N.R., Rader,C., DiMattia,M.A., Mage,R.G., Palmer,I., Kaufman,J.D., Grimes,J.M., Stuart,D.I., Steven,A.C. *et al.* (2010) Generation and characterization of a chimeric rabbit/human Fab for co-crystallization of HIV-1 Rev. *J.Mol.Biol.*, **397**, 697-708.
105. Daugherty,M.D., D'Orso,I. and Frankel,A.D. (2008) A solution to limited genomic capacity: using adaptable binding surfaces to assemble the functional HIV Rev oligomer on RNA. *Mol.Cell*, **31**, 824-834.
106. Charpentier,B., Stutz,F. and Rosbash,M. (1997) A dynamic in vivo view of the HIV-1 Rev-RRE interaction. *J.Mol.Biol.*, **266**, 950-962.
107. 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 Res.*, **19**, 1577-1583.
108. Pond,S.J., 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **106**, 1404-1408.
109. 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.*, **17**, 1337-1342.
110. 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. *Mol.Cell*, **7**, 603-614.
111. Battiste,J.L., Mao,H., Rao,N.S., Tan,R., Muhandiram,D.R., Kay,L.E., Frankel,A.D. and Williamson,J.R. (1996) Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex. *Science*, **273**, 1547-1551.
112. Potter,S.J., Chew,C.B., Steain,M., Dwyer,D.E. and Saksena,N.K. (2004) Obstacles to successful antiretroviral treatment of HIV-1 infection: problems & perspectives. *Indian J.Med.Res.*, **119**, 217-237.
113. Boucher,C.A., Tersmette,M., Lange,J.M., Kellam,P., de Goede,R.E., Mulder,J.W., Darby,G., Goudsmit,J. and Larder,B.A. (1990) Zidovudine sensitivity of human immunodeficiency viruses from high-risk, symptom-free individuals during therapy. *Lancet*, **336**, 585-590.
114. Larder,B.A. and Kemp,S.D. (1989) Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science*, **246**, 1155-1158.
115. Chen,Z., Li,Y., Schock,H.B., Hall,D., Chen,E. and Kuo,L.C. (1995) Three-dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials. *J.Biol.Chem.*, **270**, 21433-21436.
116. Baltimore,D. (1988) Gene therapy. Intracellular immunization. *Nature*, **335**, 395-396.
117. Nielsen,M.H., Pedersen,F.S. and Kjems,J. (2005) Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology*, **2**, 10.
118. Symonds,G.P., Johnstone,H.A., Millington,M.L., Boyd,M.P., Burke,B.P. and Breton,L.R. (2010) The use of cell-delivered gene therapy for the treatment of HIV/AIDS. *Immunol.Res.*, **48**, 84-98.
119. von Laer,D., Hasselmann,S. and Hasselmann,K. (2006) Gene therapy for HIV infection: what does it need to make it work? *J.Gene Med.*, **8**, 658-667.
120. Amado,R.G., Mitsuyasu,R.T., Rosenblatt,J.D., Ngok,F.K., Bakker,A., Cole,S., Chorn,N., Lin,L.S., Bristol,G., Boyd,M.P. *et al.* (2004) Anti-human immunodeficiency virus hematopoietic progenitor cell-delivered ribozyme in a phase I study: myeloid and lymphoid reconstitution in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. *Hum.Gene Ther.*, **15**, 251-262.
121. Bahner,I., Kearns,K., Hao,Q.L., Smogorzewska,E.M. and Kohn,D.B. (1996) Transduction of human CD34+ hematopoietic progenitor cells by a retroviral vector expressing an RRE decoy inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in myelomonocytic cells produced in long-term culture. *J.Virol.*, **70**, 4352-4360.
122. Mitsuyasu,R.T., Merigan,T.C., Carr,A., Zack,J.A., Winters,M.A., Workman,C., Bloch,M., Lalezari,J., Becker,S., Thornton,L. *et al.* (2009) Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells. *Nat.Med.*, **15**, 285-292.
123. Engel,B.C. and Kohn,D.B. (1999) Stem cell directed gene therapy. *Front Biosci.*, **4**, e26-e33.
124. MacPherson,J.L., Boyd,M.P., Arndt,A.J., Todd,A.V., Fanning,G.C., Ely,J.A., Elliott,F., Knop,A., Raponi,M., Murray,J. *et al.* (2005) Long-term survival and concomitant gene expression of ribozyme-transduced CD4+ T-lymphocytes in HIV-infected patients. *J.Gene Med.*, **7**, 552-564.
125. Morgan,R.A., Walker,R., Carter,C.S., Natarajan,V., Tavel,J.A., Bechtel,C., Herpin,B., Muul,L., Zheng,Z., Jagannatha,S. *et al.* (2005) Preferential survival of CD4+ T lymphocytes engineered with anti-human immunodeficiency virus (HIV) genes in HIV-infected individuals. *Hum.Gene Ther.*, **16**, 1065-1074.
126. Cohen,J. (2007) Building an HIV-proof immune system. *Science*, **317**, 612-614.
127. Fanning,G., Amado,R. and Symonds,G. (2003) Gene therapy for HIV/AIDS: the potential for a new therapeutic regimen. *J.Gene Med.*, **5**, 645-653.
128. Schambach,A., Galla,M., Maetzig,T., Loew,R. and Baum,C. (2007) Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors. *Mol.Ther.*, **15**, 1167-1173.
129. Malim,M.H., Freimuth,W.W., Liu,J., Boyle,T.J., Lyerly,H.K., Cullen,B.R. and Nabel,G.J. (1992) Stable expression of transdominant Rev protein in human T cells inhibits human immunodeficiency virus replication. *J.Exp.Med.*, **176**, 1197-1201.

130. Woffendin,C., Ranga,U., Yang,Z., Xu,L. and Nabel,G.J. (1996) Expression of a protective gene-prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **93**, 2889-2894.
131. Bunnell,B.A. and Morgan,R.A. (1998) Gene therapy for infectious diseases. *Clin.Microbiol.Rev.*, **11**, 42-56.
132. Gottfredsson,M. and Bohjanen,P.R. (1997) Human immunodeficiency virus type I as a target for gene therapy. *Front Biosci.*, **2**, d619-d634.
133. Heguy,A. (1997) Inhibition of the HIV Rev transactivator : a new target for therapeutic intervention 1. *Front Biosci.*, **2**, d283-d297.
134. Kjems,J. and Askjaer,P. (2000) Rev protein and its cellular partners. *Adv.Pharmacol.*, **48**, 251-298.
135. Kohn,D.B., Bauer,G., Rice,C.R., Rothschild,J.C., Carbonaro,D.A., Valdez,P., Hao,Q., Zhou,C., Bahner,I., Kearns,K. *et al.* (1999) A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a rev-responsive element decoy gene into CD34(+) cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood*, **94**, 368-371.
136. Lamothe,B. and Joshi,S. (2000) Current developments and future prospects for HIV gene therapy using interfering RNA-based strategies. *Front Biosci.*, **5**, D527-D555.
137. Michienzi,A., Castanotto,D., Lee,N., Li,S., Zaia,J.A. and Rossi,J.J. (2003) RNA-mediated inhibition of HIV in a gene therapy setting. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1002**, 63-71.
138. Singwi,S. and Joshi,S. (2000) Potential nuclease-based strategies for HIV gene therapy. *Front Biosci.*, **5**, D556-D579.
139. Lee,N.S., Dohjima,T., Bauer,G., Li,H., Li,M.J., Ehsani,A., Salvaterra,P. and Rossi,J. (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat.Biotechnol.*, **20**, 500-505.
140. Soejitno,A., Wihandani,D.M. and Kuswardhani,T. (2009) The therapeutic potential of RNA interference in controlling HIV-1 replication. *Acta Med.Indones.*, **41**, 215-221.
141. Bogerd,H.P., Echarri,A., Ross,T.M. and Cullen,B.R. (1998) Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J.Virol.*, **72**, 8627-8635.
142. Fumagalli,S., Totty,N.F., Hsuan,J.J. and Courtneidge,S.A. (1994) A target for Src in mitosis. *Nature*, **368**, 871-874.
143. Taylor,S.J. and Shalloway,D. (1994) An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature*, **368**, 867-871.
144. Lukong,K.E. and Richard,S. (2003) Sam68, the KH domain-containing superSTAR2. *Biochim.Biophys.Acta*, **1653**, 73-86.
145. Chen,T., Damaj,B.B., Herrera,C., Lasko,P. and Richard,S. (1997) Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Mol.Cell Biol.*, **17**, 5707-5718.
146. Jones,A.R. and Schedl,T. (1995) Mutations in *gld-1*, a female germ cell-specific tumor suppressor gene in *Caenorhabditis elegans*, affect a conserved domain also found in Src-associated protein Sam68. *Genes Dev.*, **9**, 1491-1504.
147. Chen,T., Damaj,B.B., Herrera,C., Lasko,P. and Richard,S. (1997) Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Mol.Cell Biol.*, **17**, 5707-5718.
148. Lin,Q., Taylor,S.J. and Shalloway,D. (1997) Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains. *J.Biol.Chem.*, **272**, 27274-27280.
149. 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. *Mol.Cancer Res.*, **1**, 48-55.
150. Itoh,M., Haga,I., Li,Q.H. and Fujisawa,J. (2002) Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 5452-5464.
151. Tremblay,G.A. and Richard,S. (2006) mRNAs associated with the Sam68 RNA binding protein. *RNA.Biol.*, **3**, 90-93.
152. Wong,G., Muller,O., Clark,R., Conroy,L., Moran,M.F., Polakis,P. and McCormick,F. (1992) Molecular cloning and nucleic acid binding properties of the GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62. *Cell*, **69**, 551-558.
153. Derry,J.J., Richard,S., Valderrama,C.H., Ye,X., Vasioukhin,V., Cochrane,A.W., Chen,T. and Tyner,A.L. (2000) Sik (BRK) phosphorylates Sam68 in the nucleus and negatively regulates its RNA binding ability. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 6114-6126.
154. Maa,M.C., Leu,T.H., Trandel,B.J., Chang,J.H. and Parsons,S.J. (1994) A protein that is highly related to GTPase-activating protein-associated p62 complexes with phospholipase C gamma. *Mol.Cell Biol.*, **14**, 5466-5473.
155. Moran,M.F., Koch,C.A., Anderson,D., Ellis,C., England,L., Martin,G.S. and Pawson,T. (1990) Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **87**, 8622-8626.
156. Richard,S., Yu,D., Blumer,K.J., Hausladen,D., Olszowy,M.W., Connelly,P.A. and Shaw,A.S. (1995) Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C gamma-1. *Mol.Cell Biol.*, **15**, 186-197.
157. Trub,T., Frantz,J.D., Miyazaki,M., Band,H. and Shoelson,S.E. (1997) The role of a lymphoid-restricted, Grb2-like SH3-SH2-SH3 protein in T cell receptor signaling. *J.Biol.Chem.*, **272**, 894-902.
158. Vogel,L.B. and Fujita,D.J. (1995) p70 phosphorylation and binding to p56lck is an early event in interleukin-2-induced onset of cell cycle progression in T-lymphocytes. *J.Biol.Chem.*, **270**, 2506-2511.
159. Fusaki,N., Iwamatsu,A., Iwashima,M. and Fujisawa,J. (1997) Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling. *J.Biol.Chem.*, **272**, 6214-6219.
160. Jabado,N., Jauliac,S., Pallier,A., Bernard,F., Fischer,A. and Hivroz,C. (1998) Sam68 association with p120GAP in CD4+ T cells is dependent on CD4 molecule expression. *J.Immunol.*, **161**, 2798-2803.
161. Sanchez-Jimenez,F., Perez-Perez,A., Gonzalez-Yanes,C., Najib,S., Varone,C.L. and Sanchez-Margalet,V. (2010) Leptin receptor activation increases Sam68 tyrosine phosphorylation and expression in human trophoblastic cells. *Mol.Cell Endocrinol.*

162. Sanchez-Margalet,V. and Najib,S. (1999) p68 Sam is a substrate of the insulin receptor and associates with the SH2 domains of p85 PI3K. *FEBS Lett.*, **455**, 307-310.
163. Sanchez-Margalet,V. and Najib,S. (2001) Sam68 is a docking protein linking GAP and PI3K in insulin receptor signaling. *Mol.Cell Endocrinol.*, **183**, 113-121.
164. Pawson,T., Gish,G.D. and Nash,P. (2001) SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.*, **11**, 504-511.
165. Najib,S., Martin-Romero,C., Gonzalez-Yanes,C. and Sanchez-Margalet,V. (2005) Role of Sam68 as an adaptor protein in signal transduction. *Cell Mol.Life Sci.*, **62**, 36-43.
166. Burd,C.G. and Dreyfuss,G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, **265**, 615-621.
167. Cote,J., Boisvert,F.M., Boulanger,M.C., Bedford,M.T. and Richard,S. (2003) Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol.Biol.Cell*, **14**, 274-287.
168. Babic,I., Jakymiw,A. and Fujita,D.J. (2004) The RNA binding protein Sam68 is acetylated in tumor cell lines, and its acetylation correlates with enhanced RNA binding activity. *Oncogene*, **23**, 3781-3789.
169. Babic,I., Cherry,E. and Fujita,D.J. (2006) SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis. *Oncogene*, **25**, 4955-4964.
170. Ishidate,T., Yoshihara,S., Kawasaki,Y., Roy,B.C., Toyoshima,K. and Akiyama,T. (1997) Identification of a novel nuclear localization signal in Sam68. *FEBS Lett.*, **409**, 237-241.
171. Chen,T., 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. *Mol.Biol.Cell*, **10**, 3015-3033.
172. Sette,C., Messina,V. and Paronetto,M.P. (2010) Sam68: a new STAR in the male fertility firmament. *J.Androl*, **31**, 66-74.
173. Paronetto,M.P., Messina,V., Bianchi,E., Barchi,M., Vogel,G., Moretti,C., Palombi,F., Stefanini,M., Geremia,R., Richard,S. et al. (2009) Sam68 regulates translation of target mRNAs in male germ cells, necessary for mouse spermatogenesis. *J.Cell Biol.*, **185**, 235-249.
174. Taylor,S.J., Resnick,R.J. and Shalloway,D. (2004) Sam68 exerts separable effects on cell cycle progression and apoptosis. *BMC.Cell Biol.*, **5**, 5.
175. Barlat,I., Maurier,F., Duchesne,M., Guitard,E., Tocque,B. and Schweighoffer,F. (1997) A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain. *J.Biol.Chem.*, **272**, 3129-3132.
176. Li,Q.H., Haga,I., Shimizu,T., Itoh,M., Kurosaki,T. and Fujisawa,J. (2002) Retardation of the G2-M phase progression on gene disruption of RNA binding protein Sam68 in the DT40 cell line. *FEBS Lett.*, **525**, 145-150.
177. Matter,N., Herrlich,P. and Konig,H. (2002) Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature*, **420**, 691-695.
178. McLaren,M. and Cochrane,A. (2009) Mapping of determinants involved in the stimulation of HIV-1 expression by Sam68. *Virology*, **385**, 93-104.
179. 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. *J.Biol.Chem.*, **276**, 8665-8673.
180. Skoczylas P. Charakterisierung der Interaktion von Sam68 mit dem HIV-1 Protein Rev in vitro und in vivo. Diplomarbeit am RIMMH. 2007.
181. Reddy,T.R., Xu,W., Mau,J.K., Goodwin,C.D., Suhasini,M., Tang,H., 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. *Nat.Med.*, **5**, 635-642.
182. Reddy,T.R., Xu,W.D. and Wong-Staal,F. (2000) General effect of Sam68 on Rev/Rex regulated expression of complex retroviruses. *Oncogene*, **19**, 4071-4074.
183. Li,J., Liu,Y., Kim,B.O. and He,J.J. (2002) Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway. *J.Virol.*, **76**, 8374-8382.
184. Reddy,T.R., Tang,H., Xu,W. and Wong-Staal,F. (2000) Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of human immunodeficiency virus and type D retroviral mRNA. *Oncogene*, **19**, 3570-3575.
185. 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. *Mol.Cell Biol.*, **23**, 92-103.
186. Li,J., Liu,Y., Park,I.W. and He,J.J. (2002) Expression of exogenous Sam68, the 68-kilodalton SRC-associated protein in mitosis, is able to alleviate impaired Rev function in astrocytes. *J.Virol.*, **76**, 4526-4535.
187. 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 Res.*, **33**, 873-879.
188. 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. *J.Virol.*, **75**, 8203-8215.
189. Henao-Mejia,J. and He,J.J. (2009) Sam68 relocation into stress granules in response to oxidative stress through complexing with TIA-1. *Exp.Cell Res.*, **315**, 3381-3395.
190. 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. *Mol.Cell*, **33**, 87-96.
191. Marsh,K., Soros,V. and Cochrane,A. (2008) Selective translational repression of HIV-1 RNA by Sam68DeltaC occurs by altering PABP1 binding to unspliced viral RNA. *Retrovirology*, **5**, 97.
192. Zhang,J., Liu,Y., Henao,J., Rugeles,M.T., Li,J., Chen,T. and He,J.J. (2005) Requirement of an additional Sam68 domain for inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by Sam68 dominant negative mutants lacking the nuclear localization signal. *Gene*, **363**, 67-76.
193. McLaren,M., Asai,K. and Cochrane,A. (2004) A novel function for Sam68: enhancement of HIV-1 RNA 3' end processing. *RNA*, **10**, 1119-1129.
194. He,J.J., Henao-Mejia,J. and Liu,Y. (2009) Sam68 functions in nuclear export and translation of HIV-1 RNA. *RNA.Biol.*, **6**, 384-386.
195. Russel,M., Lowman,H.B. and Clackson,T. Introduction of phage biology and phage display, chapter

- 1, Phage Display - A Practical Approach. 2004. Oxford University Press.
196. Specthrie,L., Bullitt,E., Horiuchi,K., Model,P., Russel,M. and Makowski,L. (1992) Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage. *J.Mol.Biol.*, **228**, 720-724.
197. Marvin,D.A. (1998) Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, **8**, 150-158.
198. Sidhu,S.S. (2001) Engineering M13 for phage display. *Biomol.Eng*, **18**, 57-63.
199. Rakonjac,J., Feng,J. and Model,P. (1999) Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII. *J.Mol.Biol.*, **289**, 1253-1265.
200. Krumpe,L.R. and Mori,T. (2006) The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs. *Int.J.Pept.Res.Ther.*, **12**, 79-91.
201. Deng,L.W., Malik,P. and Perham,R.N. (1999) Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of *Escherichia coli*. *Virology*, **253**, 271-277.
202. Click,E.M. and Webster,R.E. (1998) The TolQRA proteins are required for membrane insertion of the major capsid protein of the filamentous phage f1 during infection. *J.Bacteriol.*, **180**, 1723-1728.
203. Riechmann,L. and Holliger,P. (1997) The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell*, **90**, 351-360.
204. Russel,M. (1995) Moving through the membrane with filamentous phages. *Trends Microbiol.*, **3**, 223-228.
205. Feng,J.N., Model,P. and Russel,M. (1999) A trans-envelope protein complex needed for filamentous phage assembly and export. *Mol.Microbiol.*, **34**, 745-755.
206. Smith,G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**, 1315-1317.
207. Lowman,H.B. (1997) Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.*, **26**, 401-424.
208. Broders,O., Breitling,F. and Dubel,S. (2003) Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display. *Methods Mol.Biol.*, **205**, 295-302.
209. Jacobsson,K., Rosander,A., Bjerketorp,J. and Frykberg,L. (2003) Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptors or other Exported Proteins. *Biol.Proced.Online.*, **5**, 123-135.
210. Jacobsson,K. and Frykberg,L. (1996) Phage display shot-gun cloning of ligand-binding domains of prokaryotic receptors approaches 100% correct clones. *Biotechniques*, **20**, 1070-1071.
211. Amstutz,P., Forrer,P., Zahnd,C. and Pluckthun,A. (2001) In vitro display technologies: novel developments and applications. *Curr.Opin.Biotechnol.*, **12**, 400-405.
212. Pelletier,J. and Sidhu,S. (2001) Mapping protein-protein interactions with combinatorial biology methods. *Curr.Opin.Biotechnol.*, **12**, 340-347.
213. Jeong,K.S., Nam,Y.S. and Venkatesan,S. (2000) Deletions near the N-terminus of HIV-1 Rev reduce RNA binding affinity and dominantly interfere with Rev function irrespective of the RNA target. *Arch.Virol.*, **145**, 2443-2467.
214. Brice,P.C., Kelley,A.C. and Butler,P.J. (1999) Sensitive in vitro analysis of HIV-1 Rev multimerization. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2080-2085.
215. Graf,M., Bojak,A., Deml,L., Bieler,K., Wolf,H. and Wagner,R. (2000) Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J.Virol.*, **74**, 10822-10826.
216. 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**, e9344.
217. Graf,M., Ludwig,C., Kehlenbeck,S., Jungert,K. and Wagner,R. (2006) A quasi-lentiviral green fluorescent protein reporter exhibits nuclear export features of late human immunodeficiency virus type 1 transcripts. *Virology*, **352**, 295-305.
218. Marin,O., Sarno,S., Boschetti,M., Pagano,M.A., Meggio,F., Ciminale,V., D'Agostino,D.M. and Pinna,L.A. (2000) Unique features of HIV-1 Rev protein phosphorylation by protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett.*, **481**, 63-67.
219. Asbach B.. Charakterisierung der Interaktion von Sam68 mit SH3-Domänen – Implikationen für die HIV-Replikation. Doktorarbeit am RIMMH. 2010.
220. Mußmacher L. Selektion hoch affiner UEV-Domänen mittels Phagen-Display zur Intervention beim Tsg101/p6gag-vermittelten Abknospen von HIV-1. Diplomarbeit am RIMMH. 2004.
221. Zschörnig B. Identifikation eines SH3-Interaktionspartners des HIV-1 Transmembranproteins gp41 mittels Phagen Display . Diplomarbeit am RIMMH. 2004.
222. McConnell,S.J., Dinh,T., Le,M.H. and Spinella,D.G. (1999) Biopanning phage display libraries using magnetic beads vs. polystyrene plates. *Biotechniques*, **26**, 208-10, 214.
223. Thomas,S.L., Hauber,J. and Casari,G. (1997) Probing the structure of the HIV-1 Rev trans-activator protein by functional analysis. *Protein Eng*, **10**, 103-107.
224. Kubota,S., Nosaka,T., Cullen,B.R., Maki,M. and Hatanaka,M. (1991) Effects of chimeric mutants of human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex on nucleolar targeting signals. *J.Virol.*, **65**, 2452-2456.
225. Kubota,S., Furuta,R., Maki,M. and Hatanaka,M. (1992) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by a Rev mutant which interferes with nuclear/nucleolar localization of Rev. *J.Virol.*, **66**, 2510-2513.
226. Hakata,Y., Yamada,M., Mabuchi,N. and Shida,H. (2002) The carboxy-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 protein Rev has multiple roles in mediating CRM1-related Rev functions. *J.Virol.*, **76**, 8079-8089.
227. Edgcomb,S.P., Aschrafi,A., Kompfner,E., Williamson,J.R., Gerace,L. and Hennig,M. (2008) Protein structure and oligomerization are important for the formation of export-competent HIV-1 Rev-RRE complexes. *Protein Sci.*, **17**, 420-430.
228. Szilvay,A.M., Brokstad,K.A., Boe,S.O., Haukenes,G. and Kalland,K.H. (1997) Oligomerization of HIV-1 Rev mutants in the cytoplasm and during nuclear import. *Virology*, **235**, 73-81.
229. Trikha,R. and Brighty,D.W. (2005) Phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Rev

- trimerization-interface mutants in human cells. *J.Gen.Virol.*, **86**, 1509-1513.
230. Kalland,K.H., Szilvay,A.M., Langhoff,E. and Haukenes,G. (1994) Subcellular distribution of human immunodeficiency virus type 1 Rev and colocalization of Rev with RNA splicing factors in a speckled pattern in the nucleoplasm. *J.Virol.*, **68**, 1475-1485.
231. Furnes,C., Andresen,V. and Szilvay,A.M. (2008) Functional rescue of an oligomerization-defective HIV-1 Rev mutant by fusion with an oligomeric tag. *Arch.Virol.*, **153**, 357-362.
232. Reddy,T.R. (2000) A single point mutation in the nuclear localization domain of Sam68 blocks the Rev/RRE-mediated transactivation. *Oncogene*, **19**, 3110-3114.
233. Rondot,S., Koch,J., Breitling,F. and Dubel,S. (2001) A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat.Biotechnol.*, **19**, 75-78.
234. Lubkowski,J., Hennecke,F., Pluckthun,A. and Wlodawer,A. (1999) Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure.*, **7**, 711-722.
235. Rakonjac,J. and Model,P. (1998) Roles of pIII in filamentous phage assembly. *J.Mol.Biol.*, **282**, 25-41.
236. Crissman,J.W. and Smith,G.P. (1984) Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology*, **132**, 445-455.
237. Russel,M. and Model,P. (1989) Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it. *J.Virol.*, **63**, 3284-3295.
238. Speck,J., Arndt,K.M. and Muller,K.M. (2011) Efficient phage display of intracellularly folded proteins mediated by the TAT pathway. *Protein Eng Des Sel.*
239. Bruce,A.G., Atkins,J.F. and Gesteland,R.F. (1986) tRNA anticodon replacement experiments show that ribosomal frameshifting can be caused by doublet decoding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **83**, 5062-5066.
240. Mann A. Bedeutung cis-aktiver Sequenzmotive für die Rev-abhängige Expression eines quasi-lentiviralen Reportergens. Diplomarbeit am RIMMH. 2006.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A

A	Alanin (Ala)
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure

B

bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise

C

C	Cystein (Cys)
CA	Capsid
CFP	cyanfluoreszierendes Protein
cfu	<i>colony forming units</i>
CIP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
Crm-1	<i>chromosome region maintenance</i>
CTE	<i>constitutive transport element</i>

D

D	Aspartat (Asp)
Ddx3	DEAD box RNA Helikase
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig

E

E	Glutamat (Glu)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol

F

F	Phenylalanin (Phe)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fötales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSC	<i>foward scatter</i>
fwd	<i>forward</i>

G

G	Glycin (Gly)
g	Erdbeschleunigung
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GST	Glutathion S-Transferase

H

h	Stunde
H	Histidin (His)
HA	Hämagglutinin
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HIS	Hexa Histidin- <i>tag</i>
HIV	humanes Immunodefizienzvirus
hRIP	<i>human Rev-interacting protein</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSPC	Hämatopoetische Stammzellen
HTLV-III	humanes T-lymphotropes Virus 3

I

I	Isoleucin (Ile)
IF	Immunofluoreszenz
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid

K

K	Lysin (Lys)
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt

L

L	Leucin (Leu)
LAV-I	Lymphadenopathie-Virus
LB	Luria Bertoni
LMB	Leptomycin B

LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	
M	Methionin (Met) Molar
MA	Matrixprotein
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
μF	Mikrofarad
mM	Millimolar
N	
N	Asparagin (Asn)
NC	Nucleocapsidprotein
NES	<i>nuclear export signal</i> (Kernexportsignal)
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> (Kernlokalisierungssignal)
nm	Nanometer
NNRTIs	nicht-Nucleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren
NRTIs	Nucleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren
O	
Ω	Ohm
ORF	<i>open reading frame</i>
P	
P	Prolin (Pro)
PABP1	Poly(A)-bindendes Protein
PBMCs	mononucleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimine
PI	Protease-Inhibitoren
PIC	Präintegrationskomplex
PR	Protease
PRMTs	Protein-Arginin-Methyltransferasen
Q	
Q	Glutamin (Gln)
R	
R	Arginin (Arg)
Rev	Regulator der Expression viraler Gene
rev	<i>reverse</i>
RF	replikative Form
RHA	RNA-Helikase

RNP	Ribonucleoprotein
rpm	<i>Rotationen pro Minute</i>
RRE	<i>Rev-responsive element</i>
RT	Reverse Transkriptase Raumtemperatur
S	
S	Serin (Ser)
s/sec	Sekunde
Sam68	<i>Src-associated protein during mitosis, 68 kDa</i>
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNBs	<i>Sam68 nuclear bodies</i>
sog.	sogenannte
ss	einzelsträngig
SSC	<i>side scatter</i>
STAR	<i>signal transduction and activation of RNA</i>
T	
T	Threonin (Thr)
Tab	Tabelle
TAR	<i>Tat activation domain</i>
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	
U	<i>units</i>
üN	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i>
V	
V	Valin (Val)
Vif	viraler Infektiositätsfaktor
YFP	Gelbfluoreszierendes Protein
Vpr	<i>rapid (virales Protein)</i>
Vpu	virales Protein U
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
W	
W	Tryptophan (Trp)
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
Y	
Y	Tyrosin (Tyr)
YFP	gelbfluoreszierendes Protein
Z	
z.B.	zum Beispiel

8.2 Nucleotidsequenzen

SamR2

GAAACATATGAAGAATATGGATATGATGATACATACGCAGAACAAGTTACGAAGGCTACGAAGGCTATTACAGCCAGAGTCA
AGGGGACTCAGAATATTTATGACTATGGACATGGGGAGGTTCAAGATTCTTATGAAGCT

GI

GAAACATAGGAAGAATACGGATATGATGATACATACGCAAAAAAAGTTACGAAGGCTACGAAGGCTATTACAGCCAGAGTCA
AGGGGACTCCGAATATTTATGACTATGGACATGGGAAGGTACAAGATTCTTATGAAGCT

GII

GTAACATATGAAGGATATGGATATCATGATACATACACCGCACAAAGTTACGAAGGCTACGAAGTCTATTACAGCCTGAGTCA
AGGGGACTCAGAATATTTAGGACTATGGACATGGGGAGGTTCAAGATTCTTATGCAGCT

GIII

GAATCATTTGAAGAATATGGATATGATGATAAATAGGCAGAACAACGTTACGAAGGCGACGAAGGCTATTACAGCCAGAGTCA
AGGGGACTCAGAATATTTATGACTATGGACATGGGGAGGTTCAAGATTCTTATGAAGCT

GIV

GAAACATATGAAGAATATGGATATGATGATACATACGCAGAACAAGTTACGAAGGCTACGAAGGCTAGTACAGCCAGAGTCA
AGGGGACTCAGAATATTTATGACTATGGACATGGGGAGGTTCAAGATTCTTATGAAGCT

GV

GAAACATATGAAGAAGATGGATATGATGATACATACTCAGCACAAAGTTAGGAAGGCTACGAAGGCTATTACAGCCAGAGACA
ACGGGACTCAGAATATTTATGACTATGGACATGGGGAGGTTAAAGCTACTTATGAAGCT

GVI

GAAACATATGAAGAATATGGATATGATGATCCATACGCAGAACAAGTTAGGACGGCTACAAAGGCTATTACAGCCAGAGTCA
AGGGGACTCAGAATATTTATGACTATGGACATGGGGAGGTTTCATGGTTCTTTTGAAGCT

GVII

GAAACATATGAAGAATAGGGATATGATGATCCATACGCAGAACAAGTTACGAAGGATACAAAGGCTATTACAGCCAGAGTCA
AGGGGACTCAGAATATTTATGACTATGGACATGGGGAGGTTCAAGATTCTCATGAAGCT

GVIII

GAAACGTATGAAGAATATCGATATGATGATACATACGCAGGACAAAGTTACGAAGGCTACGTAGGCTATTACGGCTAGAGTCA
AGGGGACTCAGAATATTTATGACTATGGACATGGGGTGGTTCAAGTTTCTTATGAAGCT

GIX

GAAACATATGAAGAATATGGATATGATGATACACACGCAGAACAAGTTACGAAGGCTACGAAGGCTATTACAGCCAGAGTCA
AGGGGACTCATAATATTTATGACTATGGACATGGGGAGGTTCAAGATTCTTATGAAGCT

GX

GAAACATGTGCAGAATATGGATATGATGATACATACTCAGAACAAGTTACGAAGGCTACGAAGGCTATTACAGCCAGAGTCA
AGGGGACTCAGAATAGTATGACTATGGACATGGGGAGGTCGAAGTTTCTTATGAAGCT

GXI bzw. GXI

GATACATATGAAGAATATGGATATGATGATTCATACGCAGAACAAAGTTACGTGGCTAAGAAGGCTATTACAGCCAGAGTCAA
GGGGACTCAGAATATTATGACTATGGACATGGGGAGGTTCAAGTTCGTATGAAGCT

GXI*

GATACATATGAAGAATATGGATATGATGATTCATACGCAGAACAAAGTTACGTGGCTAAGGAAGGCTATTACAGCCAGAGTCA
AGGGGACTCAGAATATTATGACTATGGACATGGGGAGGTTCAAGATTCTTATGAAGCT

GXII

GAAACATATGAAGAATATGGATATGATGATACATACGCAGAACACAGTTACGAAGGCTACGAAGGCTATTACAGCCATAGTCA
AGGGGACTCAGAATATTAGGACTATGGACATGGGGAGGTTCAAGATTCTTATAAAGCT

Posterpräsentationen

Patricia Skoczylas, Benedikt Asbach, Christine Ludwig and Ralf Wagner (2009)

Novel concepts for HIV-1 therapy: Targeting the interaction of the HIV-1 export factor Rev and its cellular cofactor Sam68; 1. Deutsch Österreichisch Schweizerische AIDS Kongress (SÖDAK) in St. Gallen, Schweiz

Patricia Skoczylas, Benedikt Asbach, Christine Ludwig and Ralf Wagner (2010)

Novel concepts for HIV-1 therapy: Analyzing the interaction of the HIV-1 export factor Rev and its cellular cofactor Sam68; 4th European Congress of Virology in Cernobbio, Italy

Patricia Skoczylas, Benedikt Asbach, Christine Ludwig and Ralf Wagner (2010)

Analyzing the interaction of the HIV-1 export factor Rev and its cellular cofactor Sam68; XVIII International AIDS Conference in Vienna, Austria

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen sowie für die interessante Promotionsthematik und die fachlich kompetente Betreuung dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner für die bereitwillige und unkomplizierte Betreuung meiner Promotion und das Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf / Prof. Dr. André Gessner danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg.

Bei Dr. Benedikt Asbach bedanke ich mich für die intensive Betreuung während meiner experimentellen Arbeiten, seine engagierte Diskussionsbereitschaft und seine stete Hilfe bei der Erstellung dieses Manuskripts.

Desweiteren danke ich Michael Liss für seine Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen der AG Wagner für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Diskussions- und Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen und die gemeinsamen Freizeitaktivitäten bedanken. Ganz besonders danke ich den ehemaligen und derzeitigen Bewohnern des Lab66: Asli („Mudda“), Simone („Böhnchen“), Kristina („Chili“), Verena („Küken“) und Simon („Hahn im Korb“). Ich danke euch von ganzem Herzen für die tolle Zeit, die wir zusammen hatten.

Dir, Michael, danke ich für deine Liebe und Unterstützung, dein Verständnis und die Geduld, die du mir entgegengebracht hast.

Ganz besonders danke ich meinen wunderbaren Eltern für ihre Liebe und ihre bedingungslose Unterstützung in jeglicher Hinsicht.