

**Aus dem Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und  
Immunologie an der Universität Hamburg  
Abteilung: Zellbiologie und Virologie  
Leiter: Prof. Dr. med. H.-G. Kräusslich**

**Intrazellulärer Transport retroviraler  
Strukturproteine und Bildung Virus-ähnlicher  
Partikel**

**Dissertation  
zur  
Erlangung des Grades eines Doktors  
der Medizin**

**dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von  
Karen Erika Martha Streckenbach  
aus Greifswald**

**Hamburg, 2002**

*Meinen Eltern gewidmet.*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>Seite</b>
1.1. AIDS – „Acquired Immune Deficiency Syndrome“	1
1.1.1. Geschichte der Erkrankung und Übertragung	1
1.1.2. Beschreibung der Erkrankung	2
1.1.3. Therapie	3
1.2. HIV – „Human Immunodeficiency Virus“	3
1.2.1. Aufbau	3
1.2.2. Genomorganisation	4
1.2.3. Replikationszyklus	5
1.3. Funktion der einzelnen Strukturproteine im retroviralen Gag-Protein	7
1.3.1. Bedeutung des MA-Proteins für den Membrantransport	7
1.3.2. Protein-Protein-Interaktionen vermittelt durch das CA-Protein	9
1.3.3. Bindung der viralen Nukleinsäure an die NC-Bindungsdomäne	10
1.3.4. HIV-1 p6-Protein als entscheidender Faktor für die korrekte Abschnürung viraler Partikel von der Zelle	10
1.4. Bedeutung des Gag-Proteins für die retrovirale Morphogenese	11
1.4.1. Einteilung der Retroviren anhand morphogenetischer Unterschiede	11
1.4.2. Funktionelle Domänen innerhalb des Gag-Polyproteins	12
1.5. Induktion eines kontrollierten Membrantransports	13
1.6. Zielstellung	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1. Allgemeines	15
2.2. Arbeiten mit rekombinanter DNA	15
2.2.1. Reagentien	15
2.2.2. Methoden	17
2.2.2.1. Isolierung von DNA	17
2.2.2.2. Manipulation und Analyse von DNA	20
2.2.2.3. Bakterien	22
2.2.3. Plasmide	24
2.2.3.1. Vorhandene Plasmide	24

2.2.3.2.	Klonierung neuer Plasmide	25
2.3.	Arbeiten mit Säugetierzellen	34
2.3.1.	Zellkulturmaterialien	34
2.3.2.	Zellen und deren Kultivierung	35
2.3.3.	Transfektion von Säugetierzellen	35
2.4.	Biochemische Analyse von viralen Genprodukten	37
2.4.1.	Lösungen und Puffer	37
2.4.2.	Antikörper	39
2.4.3.	Methoden für die Analyse von Proteinen	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1.	Kartierung des Membrantransportsignals in HIV-MA mit Hilfe von chimären HIV-IAP-Gag-Proteinen	44
3.1.1.	Membrantransportdomänen in HIV und in murinen Intrazisternalen A-Typ-Partikeln (mIAP)	44
3.1.2.	Klonierung der chimären HIV-IAP-Gag-Proteine	44
3.1.3.	Nachweis der HIV-IAP-Fusionsproteine	47
3.1.4.	Analyse der subzellulären Lokalisation der chimären HIV-IAP-Proteine	48
3.1.5.	Nachweis von Partikelbildung und -Freisetzung aus der Zelle	48
3.1.6.	Bedeutung der N-terminalen HIV-MA-Domäne für den Membrantransport	50
3.2.	Kontrollierter Transport intrazellulärer Proteine durch Dimerisierung	51
3.2.1.	Wirkungsweise des „Dimerizers“ AP1510	51
3.2.2.	Biochemische Analyse und subzelluläre Lokalisation der FKBP-GFP-Fusionsproteine und des Src-FKBP(2)-Fusionsproteins	52
3.2.3.	Analyse der Lokalisationsänderungen der FKBP-GFP-Fusionsproteine nach Co-Transfektion mit Src-FKBP(2) und anschließender Inkubation mit AP1510	54
3.2.4.	Bedingungen für die Anwendung des „Dimerizers“ AP1510	58
3.3.	Dimerisierung – Konditionales „Targeting“ retroviraler Strukturproteine	59
3.3.1.	Bedeutung der Dimerisierungsmethode für die Analyse der viralen Morphogenese	59
3.3.2.	Klonierungsstrategie und Analyse der Expression der FKBP-IAP-Gag-Fusionsproteine	59

3.3.3.	Klonierungsstrategie für die Expression der FKBP-Gag- bzw. FKBP-Gag-Pol-Fusionsproteine von HIV	62
3.3.4.	Lokalisation und „Dimerizer“-induzierte Lokalisationsänderung der FKBP-HIV-Gag-Fusionsproteine	66
3.3.5.	Biochemische Analyse der Partikelbildung	69
3.3.6.	Morphologische Untersuchung der gebildeten Partikel	72
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
4.1.	Membrantransport und Bildung reifer Viruspartikel durch HIV-MA-IAP-Chimäre	76
4.2.	Dimerisierung als intrazelluläres Membrantransportsystem	77
4.3.	Kontrollierter Membrantransport retroviraler Strukturproteine	81
4.4.	Bildung und Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel aus nichtviralen Proteinen	85
<b>5.</b>	<b>Schlußfolgerung</b>	<b>88</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>98</b>
<b>9.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>100</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	„Acquired Immunodeficiency Syndrome“
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	„base pair“, Basenpaar
BSA	„bovine serum albumin“, Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
CA	Kapsid Protein = p24
CD4	Oberflächenmolekül auf bestimmten Zellen, dient als Rezeptor für HIV
CDC	„Center for Disease Control“
CMV	Zytomegalievirus
Δ	Delta
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„Enhanced Chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immuno-sorbent assay“
EM	Elektronenmikroskopie
Env	„envelope“, virale Glykoproteine
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKBP	FK506 Bindendes Protein
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
Gag	„group specific antigen“, retrovirale Strukturproteine
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde

HA	Hämagglutinin
HIV-1	„Human Immunodeficiency Virus“, Humanes Immundefizienzvirus Typ 1
IAP	Intrazisternale A-Typ Partikel
IN	Integrase
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LTR	„Long Terminal Repeat“, Lange Terminale Wiederholungseinheit
-M	molar, mol pro Liter
m-	Milli-
MA	Matrix Protein
MHR	„major homology region“
min	Minute(n)
MLV	Murines Leukämievirus
MPMV	Mason Pfizer Monkey Virus
MSD	„major splice donor“
myr	Myristilsäure, Myristilierung
µ-	Mikro-
NC	Nukleokapsid Protein
Nef	„negative factor“, ein akzessorisches Protein von HIV-1
°C	Grad Celsius
OD	Optische Dichte, Extinktion
ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
PBS	„phosphate buffered saline“, mit Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaktion“, Polymerasekettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Protease-Inhibitor
pNL4-3	bestimmter proviraler Klon von HIV-1
Pol	Polymerase Gene/Proteine: PR, RT und IN
PR	Proteinase
Rev	„regulator of expression of virion proteins“
RRE	„Rev response element“
RNA	Ribonukleinsäure

## VII

RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Spaltprodukte
src	pp60 <sup>src</sup>
SU	Oberflächen-Glykoprotein (gp120)
Tab.	Tabelle
Tat	„transactivator of transcription“, virales Transaktivator Protein
TGF	„transforming growth factor“
TM	Transmembranales Glykoprotein (gp41)
TR	Trunkation
U	Units, Enzymeinheiten
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vif	„viral infectivity factor“, ein akzessorisches Protein von HIV-1
Vpr	„viral protein R“, ein akzessorisches Protein von HIV-1
Vpu	„viral protein U“, ein akzessorisches Protein von HIV-1
WB	Western Blot
WHO	„World Health Organization“, Weltgesundheitsorganisation
wt	„wild-typ“, Wildtyp

## **1. Einleitung**

Viren sind infektiöse Einheiten, die sich während der Evolution in Millionen von Jahren entwickelt und an bestimmte Organismen und deren Zellstrukturen angepaßt haben. Sie replizieren sich in den von ihnen infizierten, lebenden Zellen, indem sie zelluläre Prozesse modifizieren und für die eigene Vermehrung nutzbar machen. Die Entdeckung der humanen Immundefizienzviren (HIV) und ihre Identifikation als Retroviren (Barre-Sinoussi et al., 1983) führte aufgrund ihrer großen humanpathogenen Bedeutung zu einer umfangreichen Forschungsaktivität. Aus diesem Grund sind heute bereits viele Einzelheiten der Molekularbiologie und Pathogenese retroviraler Infektionen bekannt, und diese Viren gehören zu den am besten untersuchten.

Neueste Untersuchungen belegen allerdings, daß die Infektion mit HIV ein nach wie vor wachsendes Problem darstellt. Anfang der 90er Jahre wurde HIV/AIDS lediglich als eine sehr ernstzunehmende Erkrankung eingestuft. Die damaligen Schätzungen gingen von 9 Millionen Infizierten und 5 Millionen Todesfällen bis zum Ende des Jahrtausends aus. Heute leben etwa 34,3 Millionen Menschen mit HIV, 18,8 Millionen sind weltweit bereits an den Folgen dieser Infektion gestorben, davon 3,8 Millionen Kinder. 5,4 Millionen Menschen wurden allein 1999 neu infiziert (WHO, Report 2000). AIDS ist nicht mehr nur ein gesundheitliches Problem. Speziell in den Entwicklungsländern verändert es ganze Regionen durch den massiven Einfluß auf die Bevölkerungsstruktur und damit das ökonomische Wachstum eines Landes. Diese Entwicklung zeigt, daß es notwendig ist, noch genauere Kenntnisse über die einzelnen Abschnitte im Vermehrungsweg des Virus zu erlangen. Nur so wird es möglich sein, neue Therapieansätze zu finden und damit gezielt in den Replikationszyklus des Virus einzugreifen. Das Ziel dieser Therapieansätze wäre die Erkrankung langfristig zu kontrollieren oder sogar das Virus vollständig aus dem Körper zu eliminieren.

### **1.1. AIDS – „Acquired Immune Deficiency Syndrome“**

#### **1.1.1. Geschichte der Erkrankung und Übertragung**

HIV wurde 1983 (Barre-Sinoussi et al., 1983; Montagnier et al., 1984) zum ersten Mal isoliert und als Erreger der Immundefizienzkrankheit AIDS identifiziert. Das HI-Virus ist ein Retrovirus und gehört der Untergruppe der Lentiviren an (Gelderblom, 1989; Review durch

Nermt und Hockley, 1996). Es existieren zwei verschiedene Typen von HIV: HIV-1, welches für die Mehrzahl der Infektionen und AIDS-Erkrankungen verantwortlich ist, und HIV-2, welches in einer begrenzten Anzahl von Ländern nachgewiesen werden konnte (Clavel et al., 1986).

Bei AIDS handelt es sich um eine zoonotische Erkrankung. Das primäre Reservoir für HIV-2 bildeten die Halsbandmangabe (Dietrich et al., 1989), während als Quelle für HIV-1 eine bestimmte Schimpansenart (*Pan troglodytes troglodytes*) mit mindestens drei unabhängigen Eintritten in die menschliche Population beschrieben ist (Gao et al., 1999). Es ist bekannt, daß bereits vor 1950 eine geringe Anzahl von Personen mit HIV infiziert war. Mitte der 70er Jahre begann der Erreger sich auszubreiten, aber aufgrund der langen Inkubationszeit verursachte das Virus keine epidemische Erkrankung bis in die 80er Jahre. Die Immunschwäche AIDS wurde erstmals 1981 bei einer Gruppe homosexueller Männer mit schweren opportunistischen Infektionen beschrieben (Masur et al., 1981; Durack, 1981; Gottlieb et al., 1981). Der Übertragungsweg ließ schon damals auf ein in Blut oder Blutprodukten vorhandenes Virus schließen. Weitere Übertragungswege sind Sexualkontakte, sowie die perinatale Übertragung oder das Stillen durch infizierte Mütter.

### **1.1.2. Beschreibung der Erkrankung**

Die Primärinfektion mit HIV verläuft häufig inapparent. In 20 – 30% der Fälle ist sie mit grippe- oder mononukleoseähnlichen Symptomen und Lymphknotenschwellung verbunden. Vorübergehend findet man ein Absinken der CD4+ Lymphozyten auf unter 500/µl. Hieran schließt sich häufig ein symptomfreies Latenzstadium an, das mehrere Jahre andauern kann. In dieser Phase existiert das HI-Virus in replikationskompetenter Form in latent infizierten ruhenden CD4+ Zellen. Durch autologe CD8+ Zellen und Zytokine kann das Immunsystem die stetige HIV-Replikation über eine gewisse Zeit kontrollieren (Chun et al., 1997; Chun et al., 2000). Ein Hinweis auf die weitere Verschlechterung der klinischen Situation ist meist der Abfall der CD4+ Zellen unter die kritische Grenze von 200 Zellen/µl. Zunehmende Defekte in der zellvermittelten Immunantwort, die vor allem zu sich wiederholenden Infekten mit opportunistischen Erregern und/oder dem Auftreten von malignen Tumoren führen, charakterisieren das Vollbild von AIDS. Die HIV-Erkrankung kann nach den Kriterien des „Centers for Disease Control“ (CDC) in drei Stadien unterteilt werden, die sich aus klinischen Kriterien der Krankheit sowie der Anzahl der CD4+ Zellen zusammensetzen (Kelley et al., 1997).

### **1.1.3. Therapie**

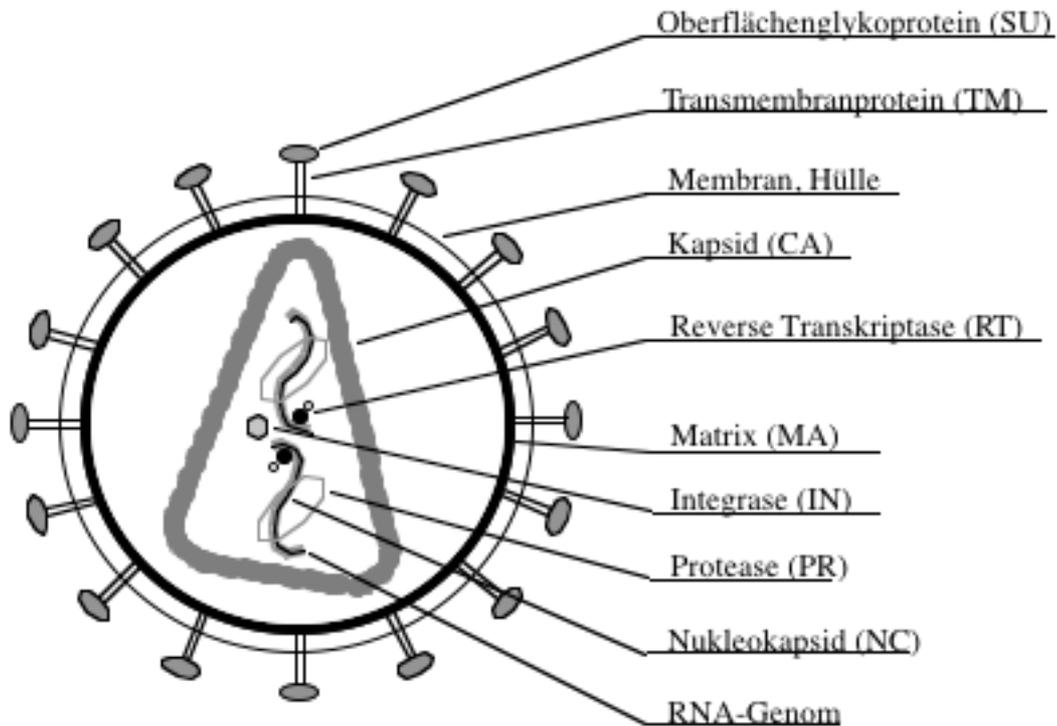
AIDS ist eine tödliche Erkrankung als Folge einer Infektion mit HIV. Als Therapie stehen derzeit antiviral wirkende Substanzen wie Hemmstoffe der Reversen Transkriptase und der viralen Protease zur Verfügung. Dem Auftreten von resistenten HIV-Varianten, deren Replikation durch die Inhibitoren nicht mehr beeinflusst werden kann, versucht man durch den Einsatz von Substanzkombinationen entgegenzuwirken. Da es unter dieser Therapie nicht zur Eliminierung des viralen Genoms aus den Zellen kommt, kann bisher nur der Eintritt der HIV-Erkrankung in das Vollbild AIDS verzögert werden. Eine Heilung des Patienten findet nicht statt. Alle Ansätze zur Entwicklung eines präventiv wirkenden Impfstoffes sind bisher an der hohen Variabilität des Erregers gescheitert.

## **1.2. HIV – „Human Immunodeficiency Virus“**

### **1.2.1. Aufbau**

Die Virushülle der Retroviren wird von einer Lipiddoppelmembran gebildet, die von der Plasmamembran der Zelle abgeleitet ist (Abb. 1). In ihr sind die viralen Glykoproteine verankert, welche für die Adsorption der Viruspartikel an zelluläre Oberflächenkomponenten verantwortlich sind. Sie bestehen aus einem Transmembranprotein (TM) und einem externen Glykoprotein (SU). Das externe Glykoprotein ist nicht kovalent mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des transmembranen Proteins verbunden. An der Innenseite der Hüllmembran befindet sich die Matrix. Deren Hauptbestandteil sind die sogenannten Matrix-Proteine (MA) (Pepinsky und Vogt, 1979; Gelderblom, 1991). Eine N-terminale Myristilierung ist essentiell für deren Anlagerung an die Plasmamembran. Durch Bildung von Trimeren entsteht eine netzähnliche Proteinschicht unterhalb der Plasmamembran. Im Inneren der Virushülle umschließt das Viruskapsid, bestehend aus den Kapsid-Proteinen (CA), das Genom des Virus. Dieses besteht im Falle der Retroviren aus zwei Kopien einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität, die von Nukleokapsid-Proteinen (NC) gebunden vorliegt. Weitere wichtige Bestandteile des Ribonukleoproteinkomplexes sind die viruskodierte Reverse Transkriptase (RT), welche die virale RNA in doppelsträngige DNA umschreibt (Baltimore et al., 1970; Temin et al., 1970) und die Integrase (IN), ein Enzym, das für die Integration dieser DNA in das Zellgenom verantwortlich ist. Zu den Bestandteilen des Viruspartikels, deren Lokalisation im Virion nicht genau bekannt ist, gehört die Protease

(PR), welche die Prozessierung der viralen Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine bewirkt und akzessorische virale Proteine (Abb. 1).



**Abb. 1) Schematische Darstellung eines HIV-1 Partikels.**

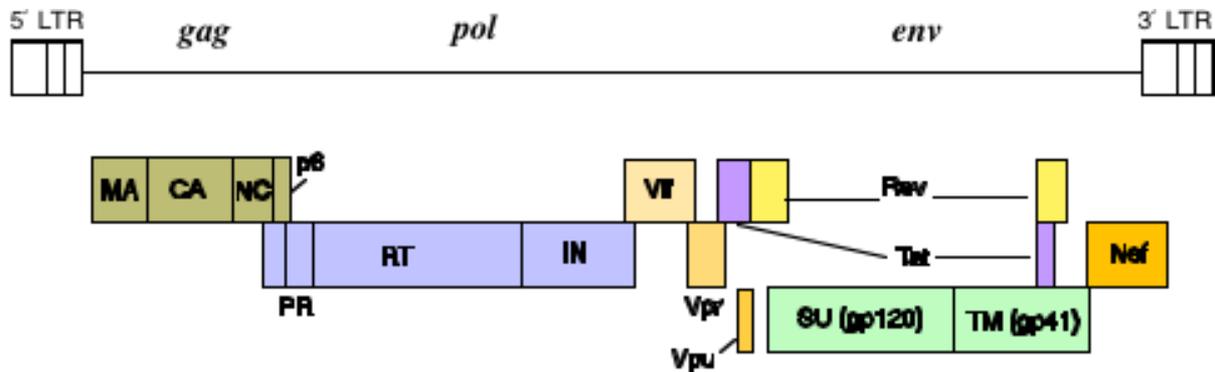
Das konische Kapsid, bestehend aus den Kapsid-Proteinen (CA), befindet sich im Inneren des Virus. Es enthält zwei virale RNA-Genome, welche im Komplex mit den Nukleokapsid-Proteinen (NC) vorliegen. Das Kapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, in welche die viralen Glykoproteine (SU, TM) eingebaut sind. An der Innenseite der Hüllmembran befindet sich eine Schicht von Matrix-Proteinen (MA).

**1.2.2. Genomorganisation**

Bei Retroviren ist die kodierende Region typischerweise von sogenannten LTRs („Long Terminal Repeat“) flankiert. LTRs sind Kontrollsequenzen, die essentiell für Reverse Transkription, Integration und Genexpression sind (Abb. 2).

Der erste Abschnitt der translatierten Region des Genoms wird als „Gag“ bezeichnet und kodiert für die viralen Strukturproteine Matrix, Kapsid, Nukleokapsid und p6. „Gag“ ist ein serologischer Begriff und bedeutet „gruppenspezifische Antigene“. Virale Protease, Reverse Transkriptase und Integrase werden durch das *pol*-Gen kodiert.

Die Glykoproteine, welche in die Virushülle integriert sind, werden durch das *env*-Gen kodiert (Abb. 2).



**Abb. 2) Genomorganisation von HIV-1**

Dargestellt sind die provirale DNA und darunter die offenen Leseraster von HIV-1. Die verschiedenen Genabschnitte *gag*, *pol* und *env* kodieren für die viralen Proteine: MA: Matrix, CA: Kapsid, NC: Nukleokapsid, p6, PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase, IN: Integrase, SU: Oberflächen-Glykoprotein (gp 120), TM: Transmembranales Glykoprotein (gp 41). Weiterhin sind die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Rev, Tat und Nef dargestellt.

### 1.2.3. Replikationszyklus

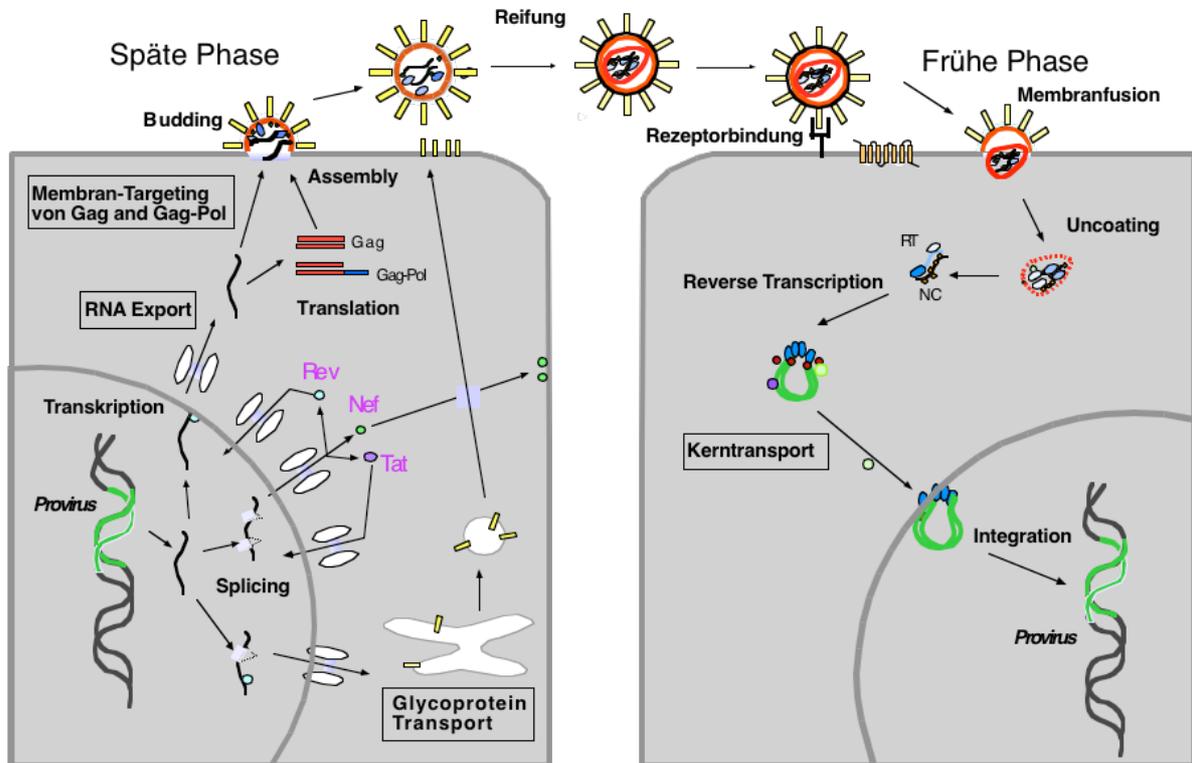
Die Replikation von HIV beginnt mit der Bindung des viralen *env*-Glykoproteins an den CD4-Rezeptor und einen Co-Rezeptor der Zielzelle. (Abb. 3; Coffin; Deng et al., 1996; Feng et al., 1996; Trkola et al., 1996). Über bestimmte Sequenzen des gp120 Oberflächenproteins interagiert das Virus mit dem CD4-Rezeptor. Diese Wechselwirkungen bewirken eine Konformationsänderung der gp120 Untereinheit, wodurch die V3-Schleife und an der Interaktion beteiligte Epitope vermehrt exponiert werden. Die Bindung an den jeweiligen Co-Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung in der Untereinheit von gp41. Dadurch wird ein Fusionspeptid freigelegt das die Verschmelzung der zellulären und viralen Membranen vermittelt (Chan et al., 1997; Chan und Kim, 1998; Weng et al., 1998). Nach der Fusion der Membranen gelangt das virale Kapsid mit dem darin enthaltenen Virusgenom in die Zelle. Im Zytoplasma der Zelle wird das einzelsträngige RNA-Genom von der Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Nach dem Transport in den Zellkern vermittelt die virale Integrase den Einbau der DNA, als sogenanntes Provirus, in das Genom der Wirtszelle. Die Genexpression erfolgt nach Transkription der Provirus-DNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Dabei werden in der frühen Phase der Genexpression vorrangig mehrfach

gespleißte mRNAs für die regulatorisch aktiven Proteine Tat („transactivator of transcription“), Rev („regulator of expression of virion proteins“) und Nef („negative factor“) gebildet. Das Nef-Protein wird bei der Freisetzung des Virus mit eingebaut und hat einen wesentlichen Einfluß auf die Infektiosität des Virus. Nach der Translation der Tat- und Rev-Proteine an den zytoplasmatischen Ribosomen werden diese wieder in den Kern transportiert. Tat hat eine transaktivierende Wirkung, welche die Transkription vom LTR-Promotor mehr als hunderdfach verstärkt. Rev ist für die zeitliche Regulation der Genexpression während des Replikationszyklus essentiell. Es reichert sich im Zellkern an und bindet sich an eine als RRE („rev response element“) bezeichnete RNA-Sequenz, die man im Bereich des *env*-Gens in allen einfach gespleißten oder ungespleißten viralen mRNA-Molekülen findet. Diese kodieren für Env-, Vif-, Vpr- und Vpu-Proteine. Auch der Kernexport der Gag- und Gag-Pol-RNA und der genomischen RNA wird auf diese Weise vermittelt. Die Interaktion bewirkt den bevorzugten Export dieser mRNA-Spezies in das Zytoplasma, wo sie in die entsprechenden Proteine translatiert werden. Bei den mehrfach gespleißten mRNAs, von denen die Proteine Tat, Rev und Nef abgelesen werden, wird das RRE durch die Spleißvorgänge als Teil eines Introns entfernt, so daß ihre Synthese unabhängig von der Bindung des Rev-Regulators erfolgt.

An den zytoplasmatischen Ribosomen erfolgt die Translation der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine. Die co-translationale Myristilierung eines N-terminal gelegenen Glycin-Restes im MA-Protein und eine Region aus positiv geladenen Aminosäuren (AS) im N-terminalen Teil von Matrix bilden ein spezifisches Membrantransportsignal und vermitteln so den Transport der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine zur Plasmamembran (Göttlinger et al., 1989; Bryant und Ratner, 1990; Kräusslich und Welker, 1996). Über das Matrix-Protein wird auch der Einbau der viralen Glykoproteine vermittelt, welche über den sekretorischen Exportweg zur Plasmamembran gelangen. Nach dem Transport der Gag-Polyproteine an die Plasmamembran kommt es dort zu Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den CA-Proteinen. Spezifische Interaktionen zwischen NC und einem RNA-Verpackungssignal innerhalb des RNA-Genoms bewirken die Enkapsidierung der viralen RNA.

Der Transport und die Bindung der Gag-Proteine an die Plasmamembran, die Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und die Bindung und Enkapsidierung der viralen RNA sind wesentliche Voraussetzungen für die Ausbildung von Ausknospungsstrukturen („Budding“) und die Freisetzung von Viruspartikeln. Die Aktivierung der viralen Protease und damit die proteolytische Spaltung der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine findet nach

Abschnürung der Viruspartikel von der Plasmamembran statt. Erst dann spricht man von einem reifen, infektiösen Virus.



### Abb. 3) Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Retroviren am Beispiel von HIV

Das Virus adsorbiert mit dem äußeren Teil des Glykoproteinkomplexes an den CD4-Rezeptor und den Co-Rezeptor, und die Hüllmembran des Virus verschmilzt mit der Zytoplasmamembran. Der RNA-Komplex wird in das Zytoplasma entlassen und von der Reserve-Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben, welche von der Integrase (IN) in das Wirtsgenom eingebaut wird. Die Provirus-DNA wird durch die RNA-Polymerase II der Zelle transkribiert. Nach der Proteinsynthese der viralen Proteine an den zytoplasmatischen Ribosomen und dem Transport zur Plasmamembran der Zelle, lagern sich die viralen Strukturproteine zusammen und es kommt zur Knospung und Freisetzung viraler Partikel. Durch proteolytische Spaltung der Strukturproteine entstehen infektiöse Viren.

## 1.3. Funktion der einzelnen Strukturproteine im retroviralen Gag-Protein

### 1.3.1. Bedeutung des MA-Proteins für den Membrantransport

Wie bereits erwähnt, sind die Zusammenlagerung der viralen Gag- und Gag-Pol-Polypeptide an der Plasmamembran, die Abschnürung der viralen Partikel und die proteolytische Spaltung

durch die virale Protease für die Bildung reifer, infektiöser Viruspartikel essentiell. Damit es zur Freisetzung der Viruspartikel kommen kann, ist ein spezifischer Transport der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine an die Plasmamembran notwendig. Dieser wird durch Membranbindungsdomänen im N-terminal gelegenen MA-Protein vermittelt.

Bei HIV spielt dabei die co-translationale Myristilierung der N-terminalen Domäne der HIV-Gag- und Gag-Pol-Polyproteine eine wesentliche Rolle (Rhee und Hunter., 1987; Weaver und Panganiban, 1990; Göttlinger et al., 1989). Die Tatsache, daß myristilierte Proteine nicht nur an der Plasmamembran, sondern auch an intrazellulären Membranen nachgewiesen wurden, sowie das Fehlen eines Myristilierungssignals in anderen retroviralen Gag-Proteinen (Schultz und Oroszlan, 1983) waren aber Hinweise darauf, daß für den spezifischen Plasmamembrantransport noch weitere Bereiche im HIV-MA-Protein eine wichtige Rolle spielen müssen (Yuan et al., 1993; Zhou et al., 1994, Kräusslich und Welker 1996). In verschiedenen Arbeiten konnte diese Region im Falle von HIV auf den N-terminalen Bereich von MA eingegrenzt werden. Die Minimalsequenz bildet ein Peptid von ca. 30 Aminosäuren, das aus vorrangig basischen Aminosäuren besteht. Diese Domäne bildet eine positiv geladene Oberfläche, durch die es zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phospholipiden an der Innenseite der Plasmamembran kommt (Hill et al., 1996; zusammengefaßt von Garoff et al., 1998). Nach Bindung der Gag-Proteine an die Plasmamembran bilden diese eine Art Netzwerk unterhalb der Lipiddoppelmembran aus (Barklis et al., 1998; zusammengefaßt von Garoff et al., 1998).

Wird die Bindung der Myristilsäure an das HIV-MA-Protein durch eine Mutation der Aminosäuresequenz für Glycin an Position 2 (zu Alanin) blockiert, kann keine Assoziation der Gag-Polyproteine mit der Membran stattfinden und Virus-„Assembly“ wird verhindert (Gheysen et al., 1989; Göttlinger et al., 1989; Bryant and Ratner, 1990). Auch durch weitere gezielte Deletionen im HIV-MA-Protein kann dieser spezifische Transport an die Plasmamembran verhindert und die Zusammenlagerung der viralen Strukturproteine blockiert werden (Freed et al., 1994; Granowitz und Goff, 1994; Rhee und Hunter, 1991; Yuan et al., 1993). Deletiert man weite Teile von HIV-MA, so führt dies zu einer Freisetzung unreifer viraler Partikel ins Endoplasmatische Retikulum (Fäcke et al., 1993). Wird allerdings HIV-MA durch ein heterologes Membrantransportsignal, wie z.B. das N-terminal gelegene myristilierte Membransignalpeptid des Src-Proteins ersetzt, können selbst in Abwesenheit des gesamten HIV-MA noch nichtinfektiöse Viruspartikel gebildet und freigesetzt werden (Wills et al., 1991; Lee and Linial, 1994; Wang et al., 1998; Reil et al., 1998).

Matrix ist nicht nur für Transport und Zusammenlagerung der Polyproteine essentiell, sondern vermittelt auch den Einbau der viralen Glykoproteine in die Virushülle. Da über die Glykoproteine die Kontaktaufnahme mit neuen Zellen stattfindet, ist dies für die Infektiosität des Virus essentiell (Dubay et al., 1992). Bestimmte Mutationen in HIV-MA beeinträchtigen die Partikelbildung nicht, verhindern aber die Inkorporation der Env-Proteine (gp120 und gp41) (Yu et al., 1992; Dorfman et al., 1994). Sowohl für das Mason-Pfizer-Monkey-Virus (MPMV) als auch für HIV wurden spezifische Interaktionen zwischen dem MA-Protein und der zytoplasmatischen Domäne des transmembranen Glykoproteins beim Einbau der viralen Glykoproteine nachgewiesen (Brody et al., 1992; Brody et al., 1994; Freed und Martin, 1995). Durch eine Verkürzung („truncation“) des langen zytoplasmatischen Anteils des Transmembranproteins ist in HIV-MA-Mutanten der Einbau des Env-Proteinkomplexes selbst in Abwesenheit des gesamten MA-Proteins möglich. Reil konnte in ihrer Arbeit zeigen, daß auch die Replikationsfähigkeit des Virus auf diese Weise erhalten bleibt (Wilk et al., 1992; Mammano et al., 1995; Reil et al., 1998).

### **1.3.2. Protein-Protein-Interaktionen vermittelt durch das CA-Protein**

Das CA-Protein als Teil des Gag-Polyproteins hat durch Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen an der Innenseite der Plasmamembran eine große Bedeutung für die Bildung viraler Partikel. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß CA-enthaltende Proteine zur Zusammenlagerung zu geordneten Strukturen befähigt sind. Diese ähneln, in Abhängigkeit vom jeweiligen Gag-Polyprotein, in ihrem Phänotyp dem reifen oder dem unreifen Kapsid. Gereinigtes CA-Protein bildete nach Expression in *Escherichia coli* tubuläre Strukturen von unterschiedlicher Länge (Gross et al., 1997).

Eine N-terminale Extension resultierte in der Bildung sphärischer Partikel, welche dem unreifen Kapsid entsprachen (Gross et al., 1998). Dies war zurückzuführen auf den Erhalt der N-terminal gelegenen Protease-Spaltstelle. Eine Extension C-terminal mit Einbeziehung der NC-Domäne und damit der C-terminal gelegenen Protease-Spaltstelle resultierte in Anwesenheit von RNA ebenfalls in der Bildung sphärischer Partikel. Die Relevanz proteolytischer Spaltstellen für die virale Morphogenese zeigte auch Wiegers indem er durch Inhibition der Spaltstellen die CA-Kondensation blockieren konnte (Kräusslich et al., 1995; Wiegers et al., 1998). An der Ausbildung der Gag-Gag-Interaktionen ist im wesentlichen die C-terminale Dimerisierungsdomäne des CA-Proteins beteiligt (zusammengefaßt von Freed, 1998). In diesem Bereich findet sich eine Region die als „major homology region“ (MHR)

bezeichnet wird und eine hohe Homologie zwischen den verschiedenen Retroviren aufweist (Wills and Craven, 1991).

### **1.3.3. Bindung der viralen Nukleinsäure an die NC-Bindungsdomäne**

Während der Zusammenlagerung der viralen Gag- und Gag-Pol-Polyproteine an der Plasmamembran findet die Enkapsidierung der viralen RNA statt (zusammengefaßt von Freed, 1998). Diese erfolgt durch spezifische Interaktionen zwischen NC-Sequenzen und einem RNA-Verpackungssignal innerhalb der genomischen RNA des Virus (Dannull et al., 1994). NC besitzt darüber hinaus eine unspezifische Nukleinsäure-Bindungsaktivität, die durch basische Reste innerhalb des Proteins vermittelt wird und zu einer Kondensierung des RNA-Genoms im Inneren des Virus beiträgt (Schmalzbauer et al., 1996; Bowzard et al., 1998). Auf diese Weise kann es auch zur Inkorporation zellulärer RNA in virale Partikel kommen.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß NC grundsätzlich für den „Assembly“-Vorgang verzichtbar ist. Durch die NC-vermittelte RNA-Bindung kommt es allerdings zu einer Vernetzung der Gag-Proteine untereinander, wodurch die Zusammenlagerung gefördert wird (Cimarelli et al., 2000).

### **1.3.4. HIV-1 p6-Protein als entscheidender Faktor für die korrekte Abschnürung viraler Partikel von der Zelle**

Das p6-Protein im C-terminalen Teil des HIV-Gag-Proteins spielt eine wesentliche Rolle bei der Abschnürung viraler Partikel von der Zelloberfläche. Deletionen und Mutationen in p6 führen zu vermindertem „Budding“ bei gleichzeitiger Größenzunahme der freigesetzten Partikel (Göttlinger et al., 1991; Huang et al., 1995). Ein ähnlicher Phänotyp konnte in kürzlich veröffentlichten Studien zum Einfluß zellulärer Faktoren auf die virale Morphogenese beobachtet werden. Das p6-Gag-Protein liegt normalerweise mono-ubiquitiniert vor. Veränderte Ubiquitinylierung beeinflusste die Partikelfreisetzung und resultierte in Störungen der Prozessierung der Gag-Polyproteine (Schubert et al., 2000; Patnaik et al., 2000).

Die Bedeutung des p6-Proteins in der späten Phase der viralen Morphogenese zeigte sich auch in Experimenten, in denen nach Deletion dieser funktionellen Bereiche in RSV oder EIAV (Parent et al., 1995; Puffer et al., 1997; Garnier et al., 1998) durch Hinzufügen des HIV-p6-

Proteins die Freisetzung viraler Partikel in normaler Form und Zahl wiederhergestellt werden konnte.

#### **1.4. Bedeutung des Gag-Proteins für die retrovirale Morphogenese**

##### **1.4.1. Einteilung der Retroviren anhand morphogenetischer Unterschiede**

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß allein die Expression des retroviralen *gag*-Gens zu einer effizienten Bildung und Freisetzung membranumhüllter partikulärer Strukturen führt (Gheysen et al., 1989; Wills et al., 1989). Gag besitzt die notwendigen funktionellen Einheiten, um einen intrazellulären Transport der viralen Proteine zu vermitteln und den Zusammenbau und die Freisetzung zu induzieren.

Nach der Synthese der Gag-Polyproteine an den freien Ribosomen des Zytosols folgen Retroviren im allgemeinen zwei verschiedenen Prozessen der Morphogenese. In den meisten Retroviren erfolgt ein direkter Transport der Gag-Vorläuferproteine an die Plasmamembran, wo etwa gleichzeitig „Assembly“ und „Budding“ stattfinden. Dieses Prinzip der Morphogenese ist für C-Typ-Viren und Lentiviren, wie z.B. HIV typisch. Die zweite morphogenetische Klasse zeichnet sich durch intrazytoplasmatische Zusammenlagerung zu unreifen partikulären Strukturen und anschließendem Transport der viralen Partikel an die Plasmamembran aus. Dort erfolgt die Umhüllung und Freisetzung. Diesen Prozess der Morphogenese durchlaufen B-, D-Typ und Spumaviren.

Darüber hinaus existieren endogene Retroviren, die in der Zelle verbleiben. Sie werden vertikal über die Keimbahnzellen übertragen und ihr Genom ist somit in allen Zellen des Organismus enthalten. Aufgrund genetischer Defekte sind sie entweder gar nicht in der Lage Partikel zu bilden, oder die gebildeten Partikel verbleiben in der Zelle und akkumulieren dort. Sehr genau untersucht sind Aufbau und Replikationszyklus der murinen Intrazisternalen A-Typ Partikel (IAP). Ein N-terminal gelegenes hydrophobes Signalpeptid, das aus 28 AS besteht, dirigiert die Zusammenlagerung der viralen Strukturproteine an die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums. Aus diesen Membranen formt sich die äußere Hülle der murinen IAPs während der Partikelbildung und deren Freisetzung in intrazelluläre Zisternen. Ein *env* konnte bei den murinen IAPs nicht nachgewiesen werden (zusammengefaßt von Kuff und Lueders, 1988). Bei den intrazellulär akkumulierenden Partikeln handelt es sich um unreife, sphärische Strukturen, die aus ungespaltenen Polyproteinen bestehen. Es konnte gezeigt werden, daß durch Austausch des N-terminal gelegenen Signalpeptids mit einem

spezifischen Membrantransportsignal der Transport der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine zur Plasmamembran umgeleitet werden kann. Der Transport an die Plasmamembran führte zur Freisetzung von Viruspartikeln und zur spezifischen Prozessierung der Strukturproteine durch Aktivierung der viralen Protease (Welker et al., 1997; Fehrmann et al., 1997).

#### **1.4.2. Funktionelle Domänen innerhalb des Gag-Polyproteins**

Trotz der Unterschiede in der Morphogenese und geringer Sequenzhomologie der viralen Strukturproteine existieren bestimmte Merkmale, die alle Retroviren gemeinsam haben (Wills und Craven, 1991). So stimmen sowohl die lineare Anordnung von MA-CA-NC im Vorläuferprotein als auch deren funktionelle Eigenschaften bei den verschiedenen Retroviren überein: Im aminoterminalen Bereich findet man die Sequenzen des MA-Proteins, durch welche der Transport und die Bindung an zelluläre Membranen vermittelt wird. Dies geschieht durch Myristilierung des N-Terminus von MA und/oder eine N-terminale Häufung basischer Aminosäuren (Zhou et al., 1994). C-terminal von MA befindet sich die CA-Domäne. Durch CA werden die für das „Assembly“ essentiellen Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Gag-Polyproteinen induziert. Verstärkt werden diese durch die RNA-Bindungseigenschaften des NC-Proteins, welche eine Vernetzung der viralen Gag-Polyproteine bewirken. Im C-terminalen Bereich des HIV Gag-Proteins befindet sich die „Late“-Domäne. Diese Region spielt offensichtlich eine entscheidende Rolle bei der effizienten Freisetzung der viralen Partikel.

In umfangreichen Deletionsstudien konnte gezeigt werden, daß in vielen Retroviren große Bereiche der Gag-Polyproteine abkömmlich sind, während bestimmte Regionen auf Mutationen sehr sensibel reagieren. Es existieren offensichtlich innerhalb der einzelnen Strukturproteine funktionelle Einheiten, die den Membrantransport, den Zusammenbau und die Freisetzung viraler Partikel im „Budding“-Prozess lenken. Diese Einheiten sind zwischen den einzelnen Retroviren austauschbar bzw. können durch nichtvirale Moleküle ersetzt werden (siehe Abschnitt 1.3.).

Es sollte daher möglich sein, ein entsprechendes Protein zu konstruieren, durch welches sich virusähnliche Partikel aus vollständig nichtviralen Modulen bilden lassen. Weiterführende Arbeiten werden allerdings dadurch erschwert, daß sowohl Ablauf als auch Kinetik des Transports unzureichend verstanden sind und Virusbildung nicht synchronisiert abläuft, daher auch nicht in ihrer Kinetik verfolgt werden kann.

### **1.5. Induktion eines kontrollierten Membrantransports**

Eine Möglichkeit der Steuerung intrazellulärer Prozesse bietet die gezielte Induktion von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Genutzt wurde diese Methode bereits zur Untersuchung von Signaltransduktion, welche durch ligandenabhängige Homo-bzw. Heterodimerisierung membranständiger Proteine vermittelt wird. Das Prinzip beruht auf einem Austausch der extrazellulären und transmembranen Domänen membranständiger Proteine mit dem heterologen Membrantransportsignal des Src-Proteins und einer Bindungsdomäne des FK506 Bindenden Proteins (FKBP12) (Spencer et al., 1993). Die Homodimerisierung dieser Fusionsproteine durch Zugabe eines als Dimer vorliegenden Bindungsmoleküls (FK1012), resultierte in einer ligandenunabhängigen Aktivierung der Rezeptoren. Der wesentliche Vorteil dieser Methode liegt in der Kontrollierbarkeit der intrazellulär ablaufenden Prozesse, da erst durch Zugabe des „Dimerizers“ die Aktivierung stattfinden kann.

Im Rahmen der viralen Morphogenese soll durch das Prinzip der Dimerisierung der Membrantransport synchronisiert werden, indem eine kontrollierte Rekrutierung viraler Gag-Proteine zur Plasmamembran stattfindet. Der Austausch des gesamten HIV-MA-Proteins mit einem heterologen Membrantransportsignal hat keinen wesentlichen Einfluß auf Bildung und Freisetzung reifer, infektiöser Partikel, wie Reil in ihren Experimenten zeigen konnte (Reil et al., 1998). Daher sollte es möglich sein, das MA-Protein mit einer Bindungsdomäne des FKBP-Proteins auszutauschen. Nach Co-Expression dieser HIV-Mutante mit einem Fusionsprotein, das aus dem Membrantransportsignal des Src-Proteins und einer oder zwei FKBP-Bindungsdomänen besteht, sollte die Zugabe des „Dimerizers“ in einem indirekten Membrantransport resultieren. In diesem Fall würde erst die Zugabe des „Dimerizers“ den Membrantransport der im Zytoplasma vorliegenden FKBP-HIV-Mutanten anregen. Damit eröffnet sich eine Möglichkeit, den Ablauf der viralen Morphogenese besser verfolgen zu können.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Allgemeines**

Die meisten der verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“ und stammten hauptsächlich von folgenden Lieferanten:

Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Pharmacia (Freiburg i.B.), Roth (Karlsruhe), Riedel de-Hean (Seelze) und Boehringer Mannheim (Mannheim).

PR Inhibitor Ro31-8959 (Saquinavir) war ein Geschenk von Hoffmann LaRoche, Welwyn Garden City, UK.

„Dimerizer“ AP1510 war ein Geschenk der Firma ARIAD Gene Therapeutics, Inc., Cambridge, MA, USA.

Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen.

Plastikwaren kamen von den Firmen: Greiner (Nürtingen), Becton-Dickinson (Heidelberg), Renner (Darmstadt) und Eppendorf (Hamburg).

Verwendete Laborgeräte, wie Zentrifugen, Inkubatoren für Bakterien und Säugetierzellen, Schüttel- und Rührgeräte, Netzgeräte, Elektrophoresekammern, Pipetten und Pipettierhilfen etc. stammten von verschiedenen Firmen. Mikroskope stammten von Leitz, Zeiss, Olympus Foto- und Filmmaterial (Röntgenfilme, Filme für die Mikrophotographie, Fotopapiere etc.) wurden über den lokalen Fachhandel gekauft.

### **2.2.Arbeiten mit rekombinanter DNA**

Alle Arbeiten mit DNA wurden nach allgemein üblichen Verfahren in entsprechend zugelassenen Labors durchgeführt (Sambrook et al., 1987). Zur besseren Standardisierung einzelner Arbeiten wurden kommerziell erhältliche Fertigkits verwendet.

#### **2.2.1. Reagentien**

##### **Wichtige Chemikalien, Lösungen, Puffer, Enzyme und Kits:**

EDTA 0,5M [pH 8.0]

Ethanol absolut (nicht vergällt)

Ethanol 70%

Isopropanol

Kalium Acetat 3M [pH 5.0]

Natrium Acetat 2M [pH 5.0]

NaCl 5M

SDS 10%

Tris-HCl 1M [pH 8.0]

TE-Puffer: 10mM Tris-HCl [pH 8.0] und 0,5mM EDTA

Phenollösung: TE-gesättigte Lösung mit 0,2% 8-Hydroxychinolin, äquibriert mit Tris-Puffer auf pH 8.0.; Aufbewahrung: lichtgeschützt bei 4°C.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Ph-Chl.): wassergesättigte Mischung im Volumen-Verhältnis 25:24:1.; Aufbewahrung: lichtgeschützt bei 4°C.

Chloroform/Isoamylalkohol (Chl-IAA): wassergesättigte Mischung im Volumenverhältnis 24:1.; Aufbewahrung: lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

Lösung I: 50mM Tris-HCl [pH 8.0], 5mM EDTA

Lösung II: 1% SDS, 0,2M NaOH

Lösung III: Kalium Acetat 3M [pH 5.0]

TE/RNase: TE mit 50 µg/ml RNase A.

50fach TAE Puffer: Tris-Base 2M, Essigsäure 0,25M, EDTA 0,05M

10fach TBE Puffer: Tris-Base 0,89M, Borsäure 0,89M, EDTA 0,02M

5fach Ladepuffer für Agarosegele: 50% Glycerin, 20mM Tris-HCl [pH 8.0], 20mM EDTA, 0,01% Brom-Phenolblau

Jet-Sorb Gel Extraktions Kit (Genomed, Bad Oeynhausen)

T7 Sequencing Kit (Pharmacia, Freiburg i.Br.), Aufbewahrung: bei -20°C

Acrylamid-Stammlösung für Sequenzgele: Acrylamid 40% (w/v), Bisacrylamid 1% (w/v)

Fixierlösung für Sequenzgele: Methanol 10%, Essigsäure 10%.

Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, Klenow Enzym, thermostabile DNA Polymerasen, Alkalische Phosphatase und RNase A wurden von folgenden Firmen bezogen: New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Boehringer Mannheim (Mannheim), Pharmacia (Freiburg i.Br.), Stratagene (Heidelberg), MBI-Fermentas (St.Leon-Rot) und Sigma (Deisenhofen). Die Aufbewahrung erfolgte grundsätzlich bei -20°C.

RNase A (Sigma, Deisenhofen): 10 mg/ml Lösung in 25mM Tris-HCl [pH 7.5] und 2mM EDTA; Erhitzen zur Inaktivierung der DNase-Aktivität und Lagern bei -20°C.

### **Medien und Reagentien für die Arbeit mit Bakterien:**

LB: Luria Medium ("Broth"): Trypton 10 g/l, Hefe Extrakt 5 g/l und NaCl 5 g/l. Sterilisierung durch Autoklavieren.

LB-Platten: LB Medium mit 1,5% Agar wurde nach dem Abkühlen in sterile 10 cm Petrischalen aus Plastik gegossen und bei 4°C aufbewahrt.

LB-Amp-Platten: LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin, nach dem Abkühlen zugesetzt. Aufbewahrung bei 4°C.

Ampicillin: 100 mg/ml in Wasser, Sterilisierung durch Filtration; Aufbewahrung bei – 20°C

## **2.2.2. Methoden**

### **2.2.2.1. Isolierung von DNA**

**Schnellaufarbeitung von DNA ("Mini-Preps")** nach dem Prinzip der alkalischen Lyse.

Alle Arbeiten wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die Puffermengen wurden für die Verwendung einer Multipipette (Eppendorf, Hamburg) optimiert.

Für die Gewinnung kleiner Mengen von Plasmid DNA wurden ca. 2 ml einer Übernachtskultur von Bakterien in 2 ml-Eppendorf-Röhrchen für 5 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,1 ml Lösung I resuspendiert und zusammen mit 0,2 ml Lösung II invertiert. Nach 5 min Inkubation wurden 0,2 ml Lösung III hinzugegeben, durch Invertieren der Röhrchen gemischt und erneut 5 – 10 min inkubiert. Der Niederschlag wurde für 10 – 15 min in einer Mikrozentrifuge bei 15000 rpm pelletiert, der Überstand in ein neues 2 ml-Röhrchen transferiert, die DNA mit 1 ml Ethanol (100%) präzipitiert und anschließend für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde in 100 µl TE/RNase gelöst und konnte dann direkt für Restriktionsverdau (analytisch 5 – 10 µl, präparativ 10 – 40 µl) oder zum Sequenzieren (16 µl) eingesetzt werden.

### **Großaufarbeitung von Plasmid DNA (CsCl<sub>2</sub> – Methode)**

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion von Säugetierzellen wurden 200 ml einer dichten Übernachtskultur von *E. coli* nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgearbeitet.

Die Bakterien wurden in 250 ml-Beckman-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3500 rpm für 8 min in der Beckman-Zentrifuge (Model J-6M) bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Lösung I resuspendiert und in ein 35 ml-Beckmann-Zentrifugenröhrchen transferiert.

Die folgenden Arbeitsgänge wurden bis zur Pelletierung des Niederschlags auf Eis durchgeführt. 12 ml Lösung II wurden zugegeben und der Inhalt der Röhren durch Invertieren gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 12 ml Lösung III hinzugefügt, wiederum invertiert und 10 min inkubiert. Bei 35000 rpm und 4°C wurde der Niederschlag für 30 min im Model Beckman J-25 pelletiert, der Überstand über einen Filter in ein neues 35 ml-Beckman Röhren überführt und zu gleichen Teilen auf ein weiteres 35 ml-Beckman Röhren verteilt. Die Präzipitation erfolgte mit 20 ml Isopropanol für mindestens 10 min. Die Nukleinsäuren wurden 15 min bei 30000 rpm abzentrifugiert und anschließend mit 20 ml 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde 10 min bei 37°C im Brutschrank getrocknet und danach in 2 ml TE-Puffer aufgenommen.

Mit 4 ml 10M LiCl pro Röhren sollte anschließend die RNA spezifisch gefällt werden. Während der (mindestens) 20 minütigen Inkubationszeit befanden sich die Ansätze auf Eis. Die gefällte RNA wurde bei 15000 g und 4°C für 15 min abzentrifugiert und der Überstand des zwischenzeitlich auf 2 Röhren verteilten Ansatzes zusammengeführt und mit 17 ml 100% Ethanol gefällt. Die bei 30000 rpm für 15 min abzentrifugierte DNA wurde mit 10 ml 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet.

Nach der Resuspension in 3,9 ml TE-Puffer mit 1% RNase erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation im CsCl-Gradienten. Dazu wurden 4,2 mg CsCl zugegeben, die Röhren gut gemischt und der Inhalt in ein Ultrazentrifugenröhren (5,1 ml Polyallomer Quick-Seal) mit Hilfe einer Pasteurpipette als Trichter überführt. Vor der Zentrifugation in der Optima TLX Ultrazentrifuge wurden 20  $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben, die Zentrifugenröhren mit CsCl (1g/ml) austariert und der Röhrenhals im Heizblock verschlossen. Die Zentrifugation erfolgte bei 24°C und 60000 rpm für 24 h im TLA 100.4 Rotor. Zum Absaugen der spezifischen DNA-Bande mit einer 2 ml-Spritze wurde das Zentrifugenröhren mit einer Kanüle belüftet. Die DNA wurde in ein 15 ml Falcon-Röhren überführt und anschließend 1 ml TE-Puffer dazugegeben. Danach wurde insgesamt fünfmal mit 4 ml n-Butanol (wassergesättigt) ausgeschüttelt. Nach dem Ausschütteln wurde jeweils die obere Phase (n-Butanol) mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Nach dem fünften Mal Ausschütteln wurde die wässrige Phase auf 4 ml TE-Puffer aufgefüllt, in ein Beckmann-Zentrifugenröhren überführt und eine Ethanolfällung durch Zugabe von 8,5 ml 100% Ethanol durchgeführt. Gewaschen wurde wieder mit 70% Ethanol und anschließend bei 30000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet, in 900  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen und zur weiteren Verringerung des Gesamtvolumens eine weitere Präzipitation mit 1 Volumen Isopropanol und 8  $\mu$ l 5M NaCl durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der

isolierten DNA erfolgte, nachdem das gewaschene und getrocknete Pellet in 450  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert war. Abschließend wurde die DNA noch einmal präzipitiert, gewaschen und in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l in TE-Puffer gelagert.

### **Konzentrationsbestimmung von DNA**

Nukleinsäuren haben eine maximale Extinktion (optische Dichte, OD) bei 260 nm. Bei einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml hat doppelsträngige DNA eine OD<sub>260</sub> von 1,0. Damit läßt sich die DNA-Konzentration berechnen.

Proteine haben eine höhere Extinktion bei 280 nm und der Quotient von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> gibt eine gewisse Auskunft über den Reinheitsgrad der DNA. Bei der DNA Präparation sollte der Quotient einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben.

### **Alkoholpräzipitation von DNA**

Zur Konzentrierung oder zum Pufferwechsel kann DNA mit Alkohol quantitativ präzipitiert und in einem neuen Puffer aufgenommen werden.

Ethanol-fällung: ein gegebenes Volumen der DNA enthaltenden Lösung wurde mit 0,1 Volumen 5M NaCl und mit 2 Volumina absolutem Ethanol versetzt und mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge für 10 bis 15 min bei voller Drehzahl pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE aufgelöst.

Isopropanol-fällung: ein gegebenes Volumen DNA wurde je nach Salzgehalt mit 0,8 bis 1,2 Volumina Isopropanol vermischt, kurz bei Raumtemperatur inkubiert, abzentrifugiert und weiterbehandelt wie für die Ethanolpräzipitation beschrieben.

### **Phenolextraktion**

Proteine können aus Lösungen mit DNA sehr effizient durch Extraktion mit Phenol entfernt werden. Dazu wurde die DNA auf ein Volumen von 200 bis 500  $\mu$ l verdünnt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Dabei gehen die Proteine in die phenolische Phase über, die durch anschließende Zentrifugation für 10 min in einer Mikrozentrifuge von der wässrigen Phase abgetrennt wurde. Nach Überführung der DNA in ein neues Röhrchen wurden Phenolreste durch zweifaches Ausschütteln mit Chloroform/Isoamylalkohol entfernt und die DNA mit Alkohol gefällt.

### 2.2.2.2. Manipulation und Analyse von DNA

#### Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Spaltungen von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurden in der Regel nach Angaben der Hersteller unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Das Volumen des zugesetzten Enzyms darf dabei 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten.

Ein diagnostischer Verdau wurde in der Regel mit 1 – 2  $\mu$ g DNA (oder 5  $\mu$ l Miniprep DNA) in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l durchgeführt.

Für präparative Zwecke wurden zwischen 2 und 20  $\mu$ g DNA (oder 10 – 40  $\mu$ l Miniprep DNA) in einem Volumen von 70 bis maximal 100  $\mu$ l verdaut.

#### Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Eine nicht-denaturierende elektrophoretische Größenauftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über 0,7 – 1,0% Agarose-Horizontal-Gele mit 2  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid in TAE Puffer bei einer Spannung von 6 – 8 Volt pro cm. Vor dem Auftragen aufs Gel wurden die Proben mit 0,2 Volumen Ladepuffer vermischt. Als Größenmarker wurde in der Regel mit *HindIII* verdaute Lambda-Phagen DNA verwendet. Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator (254 nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis über eine Videokamera mit angeschlossenem Drucker (Intas, Göttingen) dokumentiert.

#### Isolierung von DNA-Fragmenten

Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurden Gelstückchen mit den benötigten DNA-Fragmenten bei langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten. Zur anschließenden Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der "Jet-Sorb" Kit der Firma Genomed nach Angaben des Herstellers benutzt.

Prinzip: die Agarose wird in Gegenwart hoher Konzentrationen von chaotropen Salzen bei 50°C leicht geschmolzen. Unter diesen Bedingungen bindet die DNA an eine Silikatmatrix und die Agarose kann weggewaschen werden. Anschließend wird die DNA in einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt von der Matrix eluiert.

#### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in einem 50  $\mu$ l Ansatz unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 250nM dNTP's, 200 ng/ml Template-DNA, je 5pM Primer, 1 Einheit Polymerase-Mix (Taq-

Polymerase und Pfu-Polymerase 50:1) unter Verwendung des zum Enzym mitgelieferten Puffers.

PCR-Produkte, die zur Klonierung vorgesehen waren, wurden nur mit Pfu-Polymerase amplifiziert, um die Wahrscheinlichkeit PCR bedingter Mutationen zu minimieren. Für die Klonierung, sowie für die Einführung von Mutationen in DNA-Fragmente wurden die Primer entsprechend mit Restriktionsschnittstellen bzw. mit Nukleotidänderungen versehen, wobei darauf geachtet wurde, daß der an der Template-DNA hybridisierende Teil groß genug war (je nach GC-Gehalt > 18 nt). Die Reaktion wurde je nach Primerkombination und Fragmentlänge in einem MJ-Research PTC 200 Thermocycler mit Deckelheizung (Biozym, Oldenhausen) über 30 Zyklen durchgeführt. Für die Amplifikation von Fragmenten mit Restriktionsschnittstellen im Primerbereich wurde die Hybridisierungstemperatur zur Erhöhung der Spezifität ab dem 11. Zyklus deutlich heraufgesetzt. Anschließend wurde das jeweils amplifizierte Fragment über ein Agarosegel aufgereinigt, nach Schneiden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einen Vektor kloniert und durch Sequenzieren überprüft. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Zellysaten erfolgte ohne Zusatz von Pfu-Polymerase.

### **Desoxyoligonukleotide**

Die Desoxyoligonukleotide wurden aus der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Schreiber am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin bezogen. Eine Auflistung der verwendeten Primer befindet sich im Abschnitt 2.3.

### **Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase**

Die Abspaltung von 5'-Phosphorsäuremonoester ist notwendig, um bei Ligasereaktionen eine intramolekulare Verknüpfung des Vektors zu verhindern. Dies geschieht besonders häufig, wenn der Vektor nur mit einem Enzym geschnitten wurde. Die Vektor-DNA wurde in 200  $\mu$ l Reaktionspuffer mit alkalischer Phosphatase (5 U/ $\mu$ g DNA) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 50°C inkubiert, um dem Enzym verborgene 5'-Enden zugänglich zu machen, danach mit frischem Enzym versetzt und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch Phenolextraktion entfernt und die DNA durch Alkoholpräzipitation konzentriert.

### **Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren**

Vor jeder Ligrationsreaktion wurden die isolierten DNA-Fragmente zur groben Quantifizierung nebeneinander im Agarosegel aufgetrennt. 5 bis 50 ng Vektor-DNA wurden mit einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuß des DNA-Fragmentes in einem Gesamtansatz von 10  $\mu$ l mit 3 Einheiten T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) versetzt und für mindestens 4 Stunden bei 16°C inkubiert. Als Kontrolle wurde immer ein Ansatz mit dem Vektor allein inkubiert. Zur Transformation von kompetenten Bakterien wurden in der Regel 3  $\mu$ l des Ligrationsansatzes verwendet.

### **Sequenzierung**

Zum Sequenzieren wurde doppelsträngige Plasmid-DNA verwendet. 2-2,5  $\mu$ g DNA wurden mit 3 pmol Sequenzierprimer in einem Volumen von 200  $\mu$ l gemischt. Zur Denaturierung wurden 3  $\mu$ l 2M NaOH/2mM EDTA hinzugefügt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Anschließend wurden 3 ml 2M NH<sub>4</sub>Ac [pH 4.5], 7  $\mu$ l Wasser und 75  $\mu$ l Ethanol (100%) zugegeben und für 20 min inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Für die weiteren Schritte nach der Methode von Sanger wurden die Reagentien aus dem Sequenzierkit der Firma Pharmacia nach Angaben des Herstellers verwendet. Zum Nachweis der Sequenzierprodukte wurde  $\gamma$ -<sup>35</sup>S-dATP (spezifische Aktivität > 1000 Ci/mmol) eingebaut.

### **Sequenzgele**

Zur Sequenzanalyse wurden die Sequenzierprodukte in sechszehntigen Polyacrylamidgelen mit 7M Harnstoff aufgetrennt. Vor der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min bei 55 W vorgewärmt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 W. Anschließend wurden die Gele in 10% Essigsäure/10% Methanol für 20 min fixiert und auf ein Filterpapier übertragen. Nach Trocknung bei 80°C in einem Vakuum-Geltrockner (BioRad, München) wurde zum Nachweis der Sequenzierprodukte ein Röntgenfilm exponiert.

#### **2.2.2.3. Bakterien**

##### **Verwendete Bakterien**

Für alle Klonierungsarbeiten wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm XL-1 Blue von der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Dieser hat folgende Genotyp-Merkmale:  $\Delta$ (mcrA)183,  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F<sup>+</sup>,

proAB, lacIqZDM15, Tn10, (tetr)], und zeichnet sich durch eine sehr niedrige Rekombinationsfrequenz und eine hohe Transformierbarkeit aus.

### **Herstellung transformationskompetenter Bakterien (nach Inoue et al. 1990)**

In einem 2 l-Erlenmeyer Kolben wurden 250 ml SOB-Medium mit 2 ml Übernachtskultur *E. coli* XL-1 inokuliert und für ungefähr 24 Stunden bei 20°C kultiviert bis eine OD600 von 0,5 erreicht wurde. Danach wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, abzentrifugiert und nach Waschen mit eiskaltem TB in 25 ml TB resuspendiert. Die Bakterien wurden 10 min auf Eis inkubiert und Dimethylsulfoxid wurde auf eine Endkonzentration von 7% zugesetzt. Nach Aliquotieren in Portionen von 100-500  $\mu$ l wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Mit dieser Methode wurde eine Transformationskompetenz von bis zu  $10^9$  Kolonien/ $\mu$ g Plasmid-DNA erreicht.

### **Transformation von Bakterien**

Nach dem Auftauen transformationskompetenter *E. coli* auf Eis wurden 20  $\mu$ l Bakteriensuspension mit 3  $\mu$ l DNA (zumeist aus einem Ligationsansatz) vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 45 Sekunden einem Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad ausgesetzt, für weitere 2-3 min auf Eis inkubiert, mit 200  $\mu$ l LB-Medium versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert, um die Expression der Beta-Laktamase zu ermöglichen. Zur Selektion auf transformierte Bakterien wurde der gesamte Ansatz auf vorgetrocknete LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **Flüssigkulturen von Bakterien**

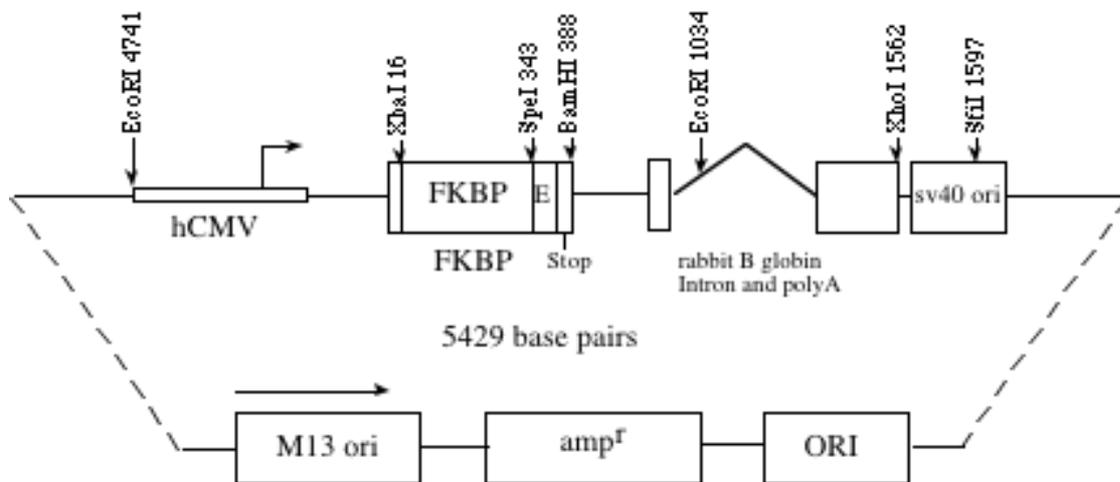
Die Kultivierung von transformierten Bakterien erfolgte immer in Gegenwart von Ampicillin. Für kleine DNA-Präparationen wurden Röhren mit 5 ml LB-Amp von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Zur Großaufarbeitung von DNA wurden 200 ml LB-Amp in einem Erlenmeyer-Kolben inokuliert und über Nacht geschüttelt.

## 2.2.3. Plasmide

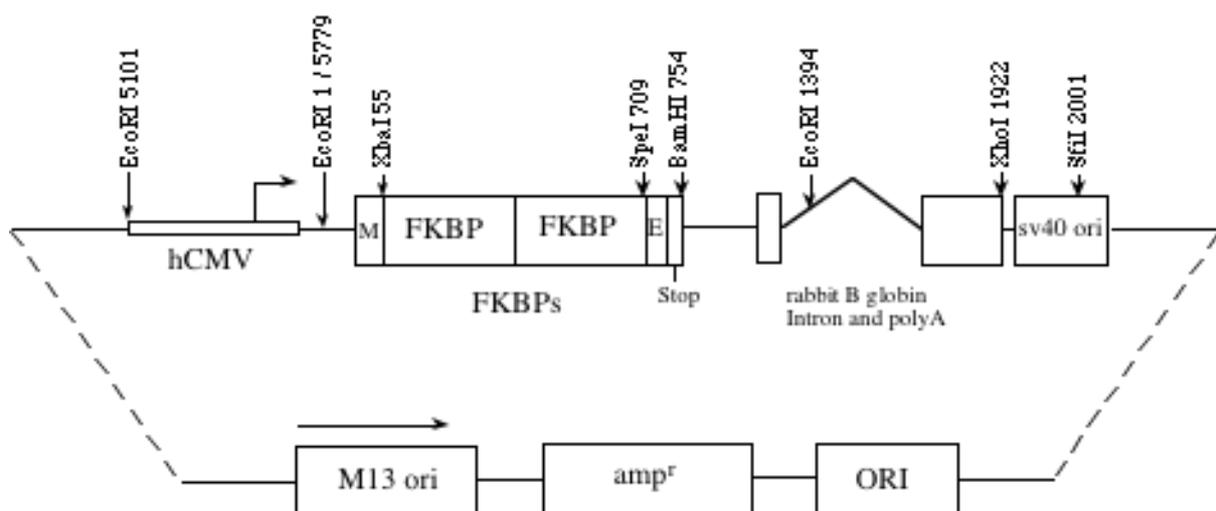
### 2.2.3.1. Vorhandene Plasmide

pCMF2E (Src-FKBP(2)), pCF1E wurden freundlicherweise von der Firma ARIAD zur Verfügung gestellt (Abb. 4a und b).

#### a) Plasmid pCF1E



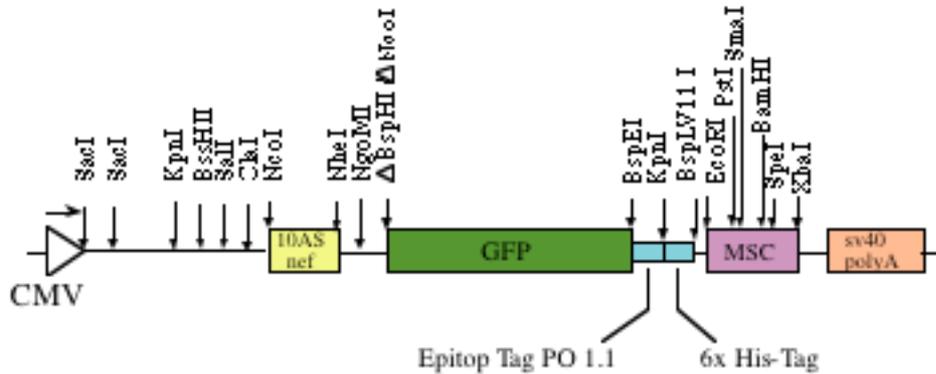
#### b) Plasmid pCMF2E



#### Abb. 4) Schematische Darstellung der Plasmide pCF1E und pCMF2E

Dargestellt sind das Plasmid pCF1E, welches eine FKBP-Bindungsdomäne mit einem C-terminalen HA Epitop-Tag (E) enthält und das Plasmid pCMF2E mit zwei FKBP-Bindungsdomänen, dem N-terminalen Myristilierungssignal (M) und dem HA Epitop-Tag (E) C-terminal.

Die Vektoren pHHR-10AS/nef-GFP, pHHR-gag-pol (H. Wodrich, Dissertation) waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.



**Abb 5) Schematische Darstellung des Plasmids HHR-10AS/nef-GFP**

Dargestellt ist das Plasmid HHR-10AS/nef-GFP mit 10 Aminosäuren aus HIV-nef gefolgt von dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP). C-terminal des GFP-Proteins befindet sich ein PO 1.1 Epitop-Tag.

Die Vektoren pHK-3U und pHHR-nef (R. Welker, Dissertation) waren ebenfalls in der Arbeitsgruppe vorhanden.

pET MA120-CA und pET MA128-CA wurden von I. Gross zur Verfügung gestellt (Gross et al., 1997)

pNL4-3TR war ein Geschenk von Valerie Bosch, DKFZ, Heidelberg (Wilk et al. 1992).

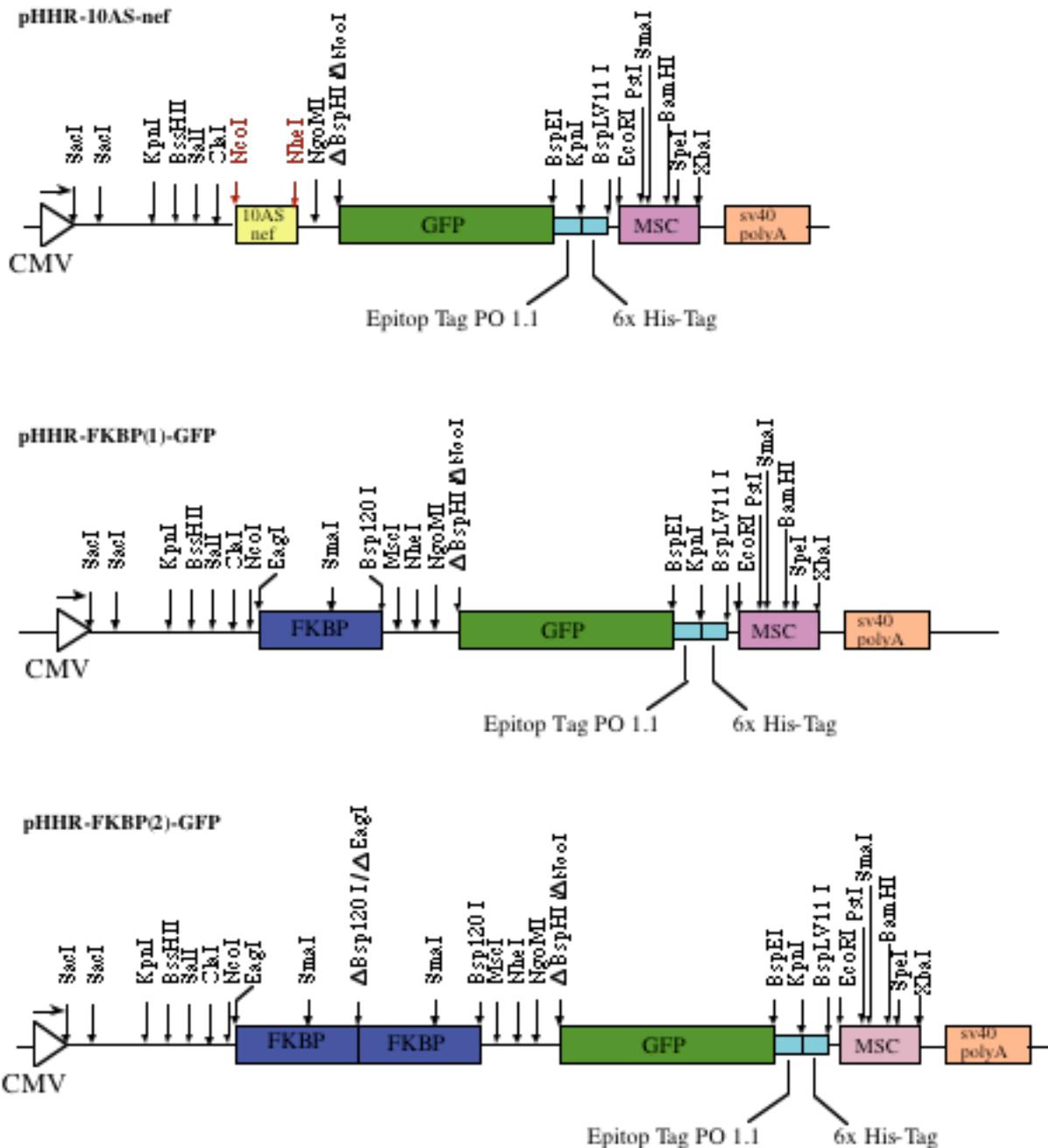
Mia2, Mia4 (Welker et al., 1997) und HM-1n waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

### 2.2.3.2. Klonierung neuer Plasmide

#### **pHHR-FKBP(1)-GFP, pHHR-FKBP(2)-GFP**

Um das FKBP-Fragment vor GFP in den HHR-10AS/nef-GFP Vektor klonieren zu können, wurde es mittels PCR aus dem pCF1E-Vektor amplifiziert. Dabei wurden mit dem FKBP-1,s-Primer eine *NcoI* und eine *EagI* Schnittstelle und mit dem FKBP-1,r-Primer eine *BspI20I*, eine *MscI* und eine *NheI* Schnittstelle eingefügt. Die 10 AS von nef, flankiert durch die Schnittstellen *NcoI* am 5'-Ende und *NheI* am 3'-Ende wurden durch das ebenfalls mit *NcoI/NheI* geschnittene FKBP-Fragment ausgetauscht.

Die Klonierung des HHR-FKBP(2)-GFP Plasmids erfolgte über den Austausch des *BspI20I*-*BspEI*-Fragments mit einem *EagI*-*BspEI*-Fragments des HHR-FKBP(1)-GFP Vektors.



**Abb. 6) Schematische Darstellung der Klonierung des FKBP-Templates in den HHR-10AS/nef-GFP-Vektor**

Über die Primer FKBP-1,s und FKBP-1,r wurde aus dem Plasmid pCF1E das FKBP-Fragment amplifiziert und anschließend über die Schnittstellen *NcoI* und *NheI* in den ebenfalls *NcoI/NheI* geschnittenen HHR-10AS/nef-GFP-Vektor eingesetzt.

### **pHK-F1, pHK-F2, pHHR-FKBP(1)-gag-pol, pHHR-FKBP(2)-gag-pol**

Plasmid pHHR-gag-pol lag bereits in der Arbeitsgruppe vor. Die Klonierung der FKBP-Fragmente in das pHHR-gag-pol Plasmid erfolgte über den Subklon pHK-3U. Zuerst wurde mit Hilfe der Primer M13 und nef13 aus dem Plasmid pHK-3U ein entsprechendes Template

amplifiziert, welches anschließend über *BamHI*–*EcoRI* wieder in das Plasmid pHK-3U eingesetzt wurde. Der entstandene Vektor wurde pHK-3UP bezeichnet. Die FKBP-Fragmente aus den HHR-FKBP(1)-GFP bzw. HHR-FKBP(2)-GFP Plasmiden wurden über *NcoI/NheI* in den Subklon umgesetzt. Die beiden neu entstandenen Plasmide erhielten die Namen pHK-F1 und pHK-F2.

Über die Restriktionsschnittstellen *ClaI* und *BspHI* wurden die FKBP-Fragmente in den mit *ClaI/NcoI* geschnittenen Vektor pHHR-gag-pol kloniert. Die resultierenden Expressionsvektoren pHHR-FKBP(1)-gag-pol und pHHR-FKBP(2)-gag-pol enthalten neben den *gag-pol*-Struktur- und Replikationsgenen auch die Sequenz für ein bzw. zwei FKBP-Proteine.

### **pHHR-FKBP(2)-MA120, pHHR-FKBP(2)-MA128, pHHR-FKBP(2)-MA120-gag-pol, pHHR-FKBP(2)-MA128-gag-pol**

Die Grundlage für die Klonierung der beiden MA-Deletionen MA120 und MA128 bildeten die Vektoren pET MA120-CA und pET MA128-CA. Diese Plasmide basieren auf dem pET 11c Vektor und enthalten HIV-Regionen als *NdeI/BamHI*-Fragment (Gross et al. 1997). MA120 kodiert ab Kodon 120 von HIV-MA und MA128 ab Kodon 128 bis zum Ende von HIV-CA. Die Plasmide wurden mit *NdeI* geschnitten und glatte Enden durch das Auffüllen mit DNA-PolymeraseI erreicht. Über die Schnittstellen *MscI* und *BamHI* wurden die Fragmente MA120-CA und MA128-CA hinter FKBP in den pHHR-FKBP(2)-GFP Vektor kloniert. Aus den so entstandenen Vektoren pHHR-FKBP(2)-MA120 und pHHR-FKBP(2)-MA128 konnten über einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *BssHII* und *SphI* die Fragmente FKBP(2)-MA120 und FKBP(2)-MA128 in den bereits beschriebenen Vektor pHHR-gag-pol kloniert werden. Die entstandenen Vektoren wurden pHHR-FKBP(2)-MA120-gag-pol und pHHR-FKBP(2)-MA128-gag-pol genannt.

### **pHHR-HIV-wt, pHHR-HIV-TR, pHHR-FKBP(2)-TR, pHHR-FKBP(2)-MA120-TR, pHHR-FKBP(2)-MA128-TR**

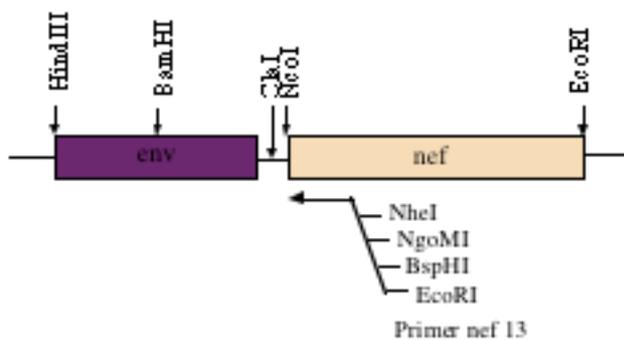
Aus den Vektoren pNL4-3TR (Geschenk von Valerie Bosch, DKFZ, HD) und pNL4-3wt wurden jeweils ein *BssHII/XhoI*-Fragment in den im Labor vorhandenen Vektor pHHR-10AS/nef kloniert. Durch eine Punktmutation im Plasmid pNL4-3TR an Position 8391 von Cytosin zu Guanin wurde ein Stopkodon eingefügt, wodurch eine Verkürzung des langen zytoplasmatischen Anteils des Transmembranproteins ab AS 712 erreicht wurde (siehe Abb. 7; Wilk et al 1992).

Um eine *NcoI* Schnittstelle im ATG von HIV-MA zu erhalten, wurde in beide Plasmide ein *BssHII/SpeI*-Fragment aus dem pNL4-3MSD Vektor (Wodrich, Dissertation) kloniert. Die Sequenz beginnt mit einer *BssHII* Schnittstelle und endet mit einer *NcoI* Schnittstelle:

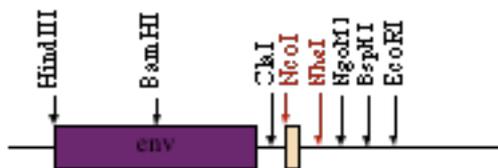
**acg gca aga ggc gag ggc cgg cga ctg gtg agt acg cca aaa att ttg act agc gga ggc tag aag gag cac cat gg**

Anschließend wurde ein *NcoI/SphI*-Fragment aus den Konstrukten HHR-FKBP(2)-gag-pol, HHR-FKBP(2)-MA120-gag-pol und HHR-FKBP(2)-MA128-gag-pol mit einem *NcoI/SphI*-Fragment des Vektors pHHR-HIV-TR ausgetauscht. Diese Plasmide wurden pHHR-FKBP(2)-TR, pHHR-FKBP(2)-MA120-TR und pHHR-FKBP(2)-MA128-TR genannt. Sie enthalten die gesamte kodierende Region von HIV und haben einen pHHR-Hintergrund.

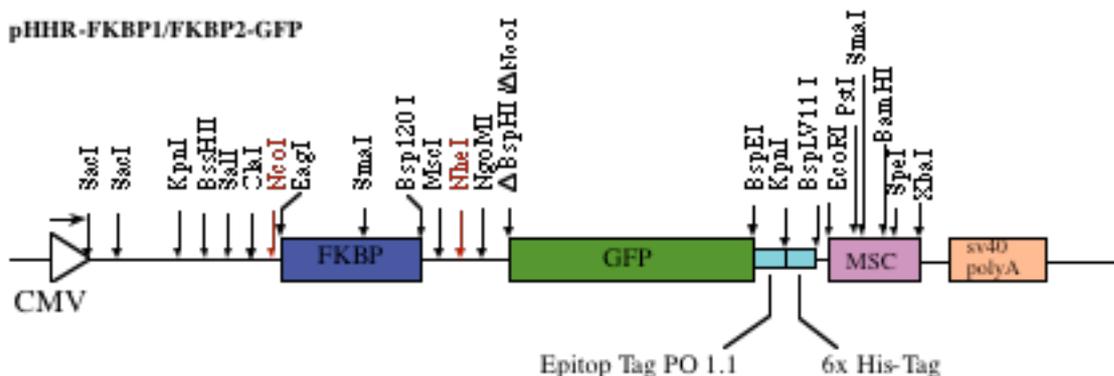
pHK-3U



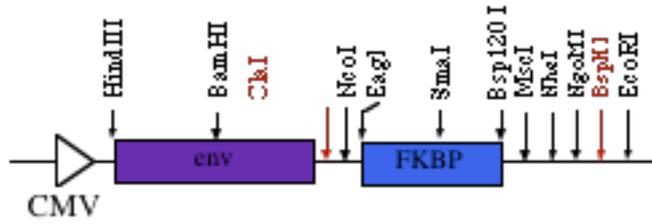
pHK-3UP



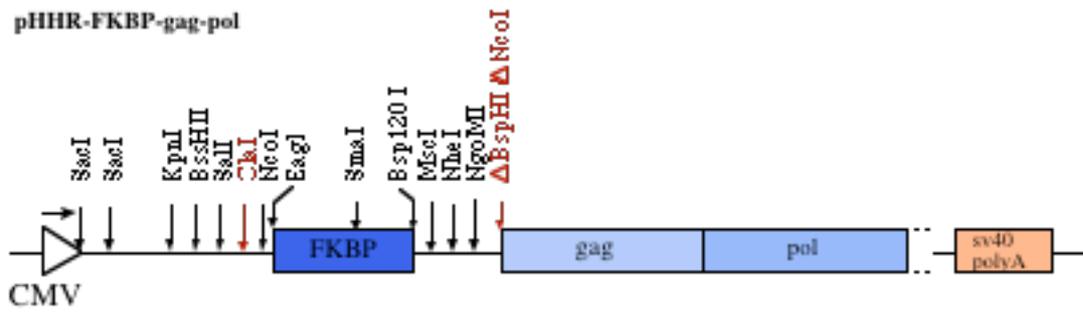
pHHR-FKBP1/FKBP2-GFP



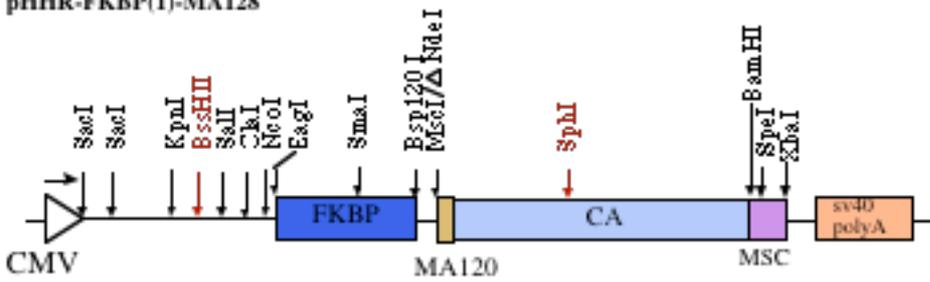
pHK-F1/2



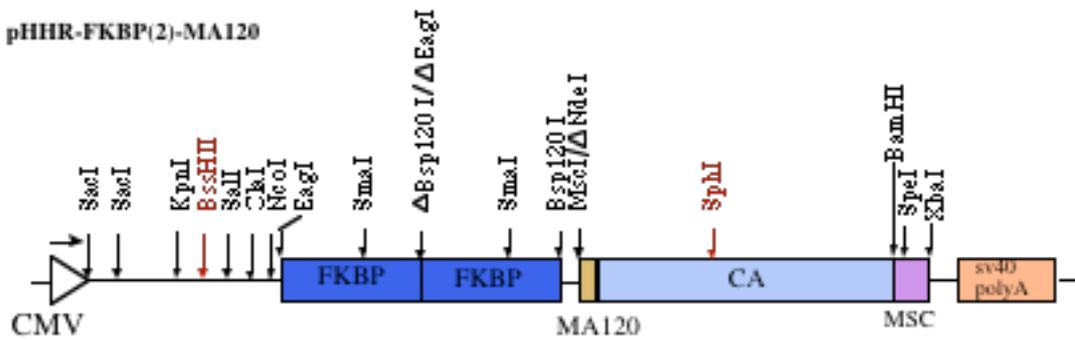
pHHR-FKBP-gag-pol



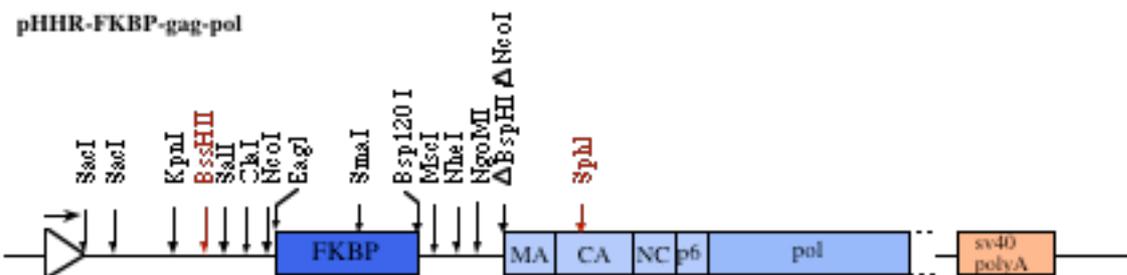
pHHR-FKBP(1)-MA128

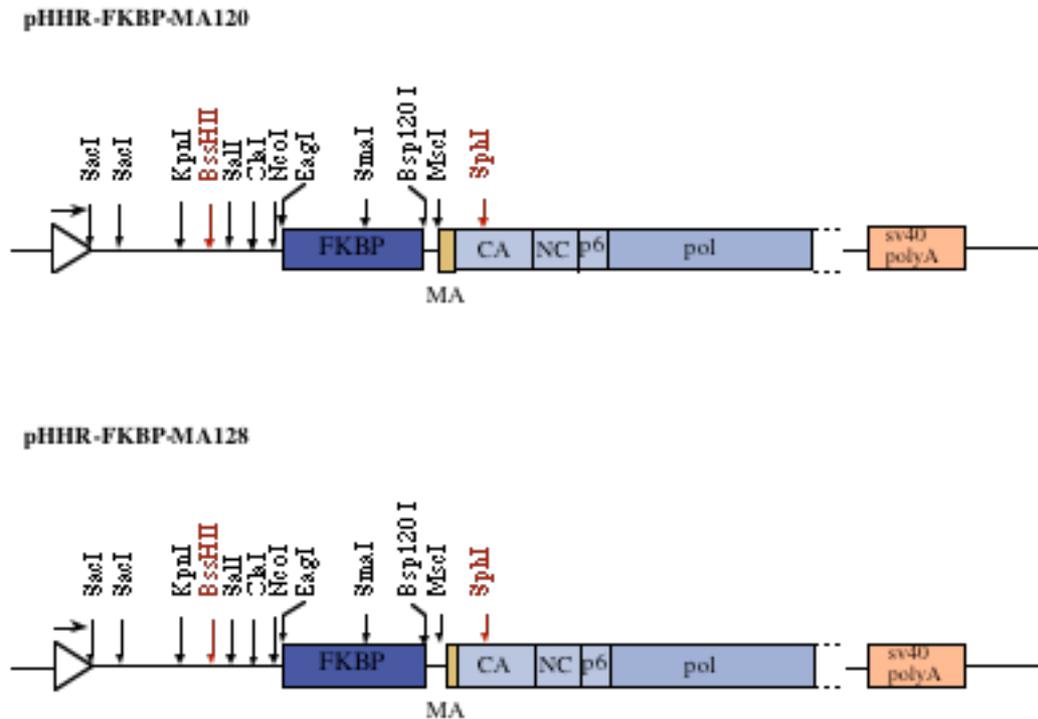


pHHR-FKBP(2)-MA120



pHHR-FKBP-gag-pol





**Abb. 7) Schematische Darstellung der Klonierung der HHR-FKBP-gag-pol und HHR-FKBP-MA120/MA128-gag-pol Vektoren**

Dargestellt ist die Klonierung des FKBP-Fragments in den HHR-gag-pol-Vektor über den Subklon pHK-3U, wodurch die zur weiteren Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen zur Verfügung gestellt wurden. Anschließend wurden die beiden Fragmente mit den MA-Deletionen MA120 und MA128 über die Schnittstellen *BssHIII* und *SphI* in den HHR-FKBP-MA120/MA128-gag-pol Vektor kloniert.

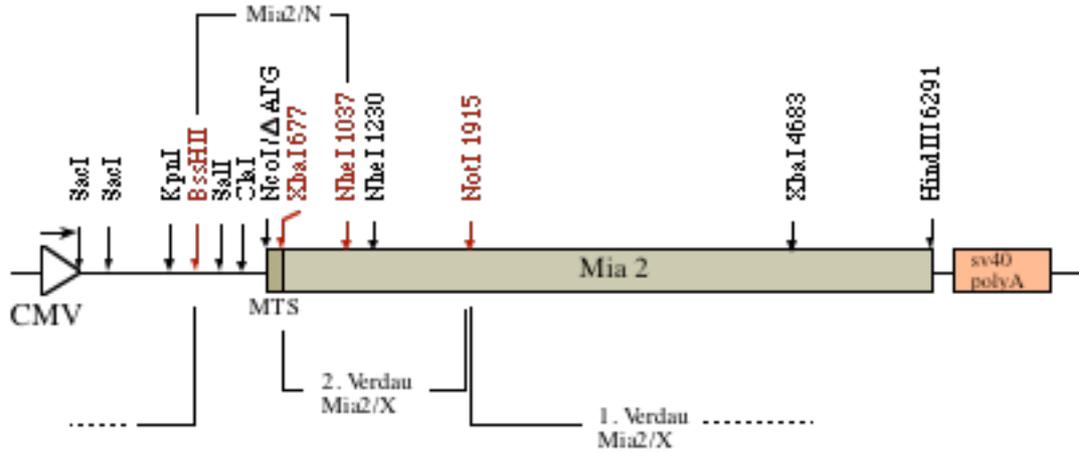
#### **pHHR-Mia2, pHHR-FKBP(2)-Mia2/X, pHHR-FKBP(1)-Mia2/X, pHHR-FKBP(1)-Mia2/N, pHHR-FKBP(2)-Mia2/N**

Über den in der Arbeitsgruppe schon vorhandenen Expressionsvektor pHHR-Mia2 konnten durch Austausch des *BssHIII/NheI*-Fragments mit einem *BssHIII/NheI*-Fragment aus dem pHHR-FKBP(1)-GFP bzw. pHHR-FKBP(2)-GFP Vektor etwa 2/3 der für das Mia2-MA-Protein kodierenden Sequenz mit einem bzw. zwei FKBP ersetzt werden. Diese über die Schnittstelle *NheI* (Position 1230) klonierten Plasmide wurden pHHR-FKBP(1)-Mia2/N und pHHR-FKBP(2)-Mia2/N bezeichnet.

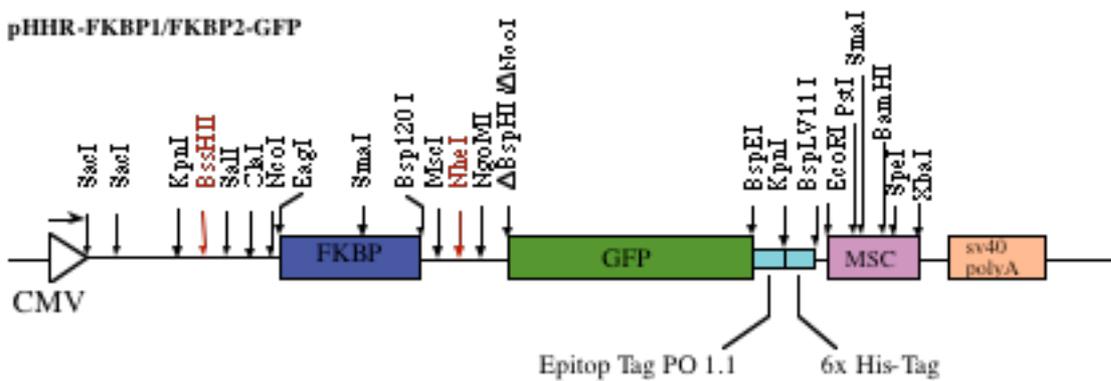
Um die ersten 28 hydrophoben AS von Mia2-MA, welche von einer *XbaI* Schnittstelle (677) begrenzt werden, deletieren zu können, mußte der Vektor pHHR-Mia2 mit *BssHIII* (im pHHR-Vektor) und *NotI* (1915) geschnitten werden. Anschließend wurde der Vektor mit *XbaI* und *NotI* geschnitten. Das gesuchte Fragment mit einer Länge von ca. 1240 bp wurde zusammen mit den *BssHIII/NheI* flankierten FKBP-Fragmenten in einer drei-Fragment-Ligation in den

Vektor kloniert. Auch diese Vektoren wurden nach der relevanten Schnittstelle benannt: pHHR-FKBP(1)-Mia2/X und pHHR-FKBP(2)-Mia2/X.

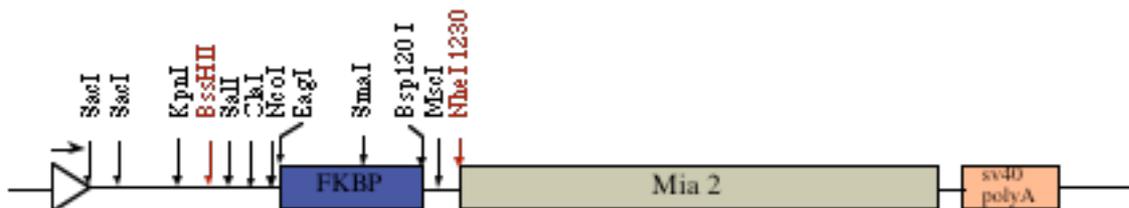
#### pHHR-Mia2



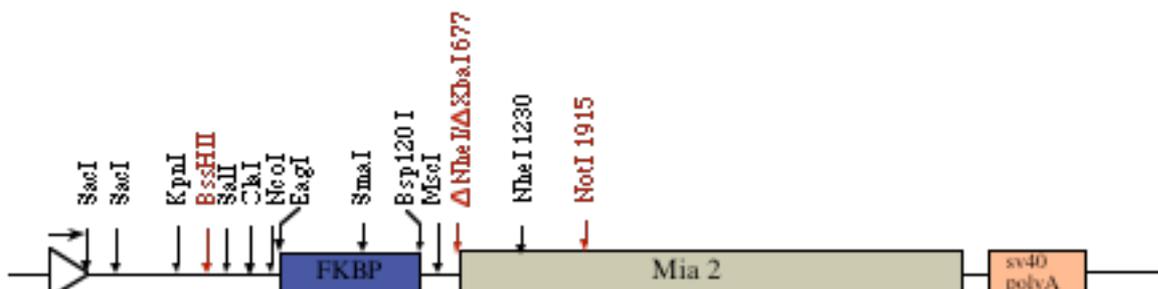
#### pHHR-FKBP1/FKBP2-GFP



#### pHHR-FKBP-Mia2/N



#### pHHR-FKBP-Mia2/X



**Abb. 8) Schematische Darstellung der Klonierung der HHR-FKBP-Mia2/N und HHR-FKBP-Mia2/X Vektoren**

Bei der Klonierung des HHR-FKBP-Mia2/N Vektors wurde ein mit *BssHII* und *NheI* geschnittenes FKBP-Fragment in den ebenfalls *BssHII/NheI* geschnittenen HHR-Mia2 Vektor eingesetzt. Für die Klonierung von HHR-FKBP-Mia2/X wurde zuerst der Vektor über *BssHII* und *NotI* geöffnet. Anschließend wurde ein *XbaI/NotI*-Fragment aus dem Mia2 Vektor und ein *BssHII/NheI*-Fragment (FKBP) aus dem HHR-FKBP-GFP Vektor über eine Dreipunktligation in den *BssHII/NotI* geöffneten HHR-Mia2 Vektor kloniert.

MTS – Membrantransportsignal (28 hydrophobe AS)

**HM-1n, HM-2n, HM-4n, HM-5n, HM-6n**

Diese Plasmide lagen im Labor bereits vor:

HM-1n: enthält aus HIV-Isolat BH10 die 5'-untranslatierte Region, welche kurz vor der *BssHII* Schnittstelle beginnt und die gesamte kodierende Region von HIV-MA enthält. Über eine künstlich eingefügte *NheI* Schnittstelle am 3' Ende wurde dieses Fragment an Position 1231 mit der Mia2-Sequenz fusioniert.

HM-2n: Der Vektor entspricht dem des Plasmids HM-1n. Die 5' Region enthält bei diesem Plasmid allerdings nur HIV-MA bis Kodon 25, das über eine künstlich eingefügte *SpeI* Schnittstelle (nichtpublizierte Mutante) an Kodon 29 (*XbaI* an Position 677) von Mia fusioniert wurde.

HM-4n: Dieses Plasmid enthält die HIV-MA Sequenz bis Kodon 58, welches einer mit Klenow aufgefüllten *AccI* Schnittstelle endet, über das bereits beschriebene *XbaI* 677, ebenfalls mit Klenow aufgefüllt, in den HM-1n Vektor kloniert.

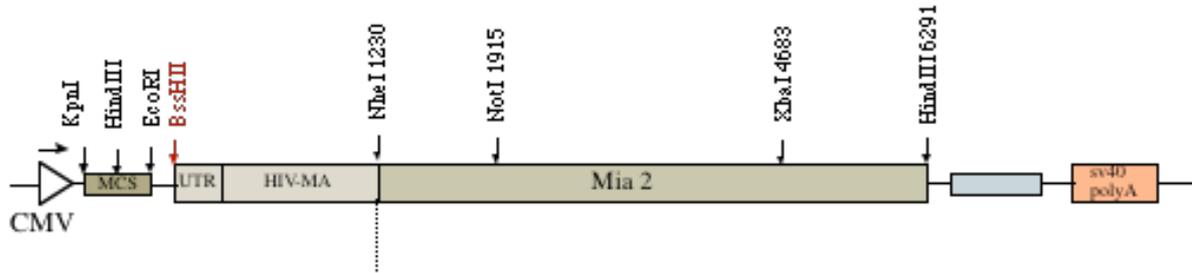
HM-5n: Für dieses Plasmid wurde ebenfalls mit *AccI* geschnitten und die Enden mit Klenow aufgefüllt. Dieses Fragment wurde dann über die *StuI* Schnittstelle an Kodon 60 (Position 769) der IAP-Sequenz fusioniert.

HM-6n: Über eine künstlich eingefügte *NheI* Schnittstelle an Kodon 30 von HIV-MA wurde dieses Fragment über die *XbaI* Schnittstelle an Position 677 in die Mia2 Sequenz eingefügt.

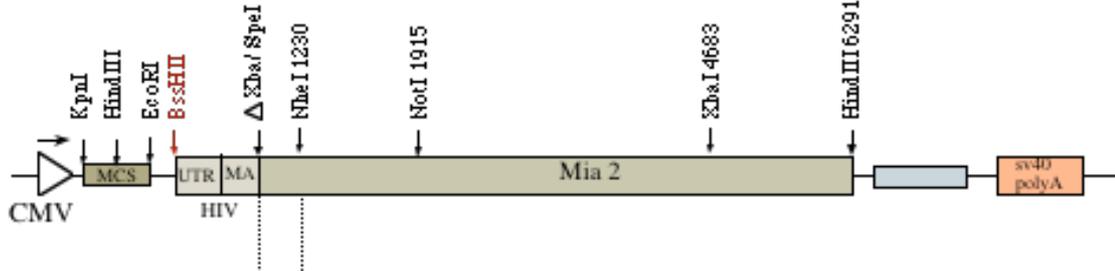
**Mia4a, HM-1an, HM-2an, HM-4an, HM-5an**

Der vorhandene Vektor Mia4a enthält eine Punktmutation an Position 2677 von GAT zu GCT (Welker et al, 1997). Die Vektoren HM-1n und Mia4a wurden mit *KpnI* und *NotI* geschnitten und das aus dem HM-1n Vektor resultierende Fragment in Mia4a eingesetzt. Das neue Konstrukt wurde HM-1an bezeichnet. Alle weiteren Plasmide wurden aus den jeweiligen Vorläuferplasmiden als *BssHII/NotI* Fragment in den neu entstandenen Vektor kloniert.

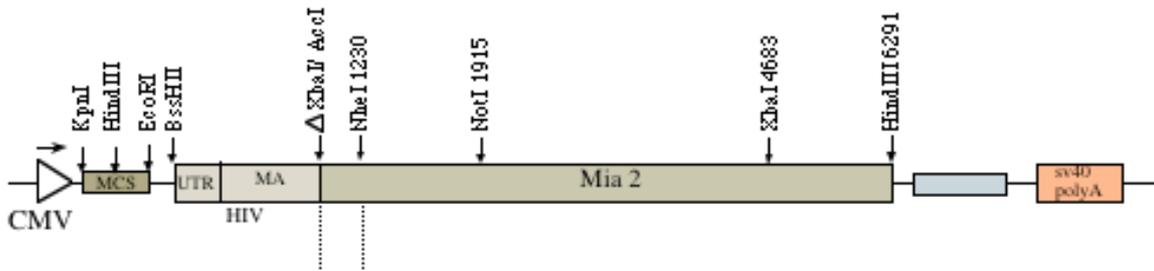
pHM-1n (gesamte kodierende Region von HIV-MA an Position 1231 von Mia2)



pHM-2n (24 AS HIV-MA an Position 28 von Mia2)



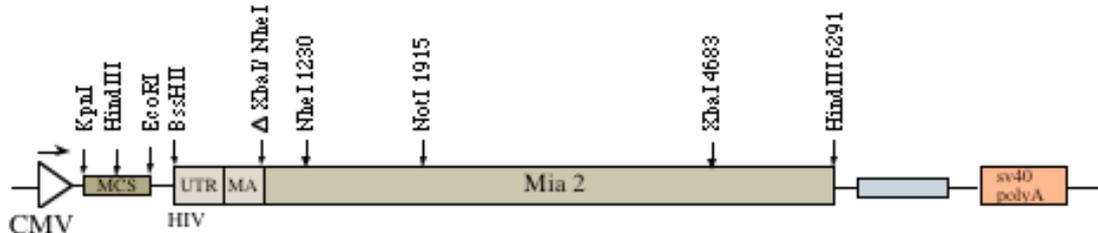
pHM-4n (65 AS HIV-MA an Position 28 von Mia2)



pHM-5n (65 AS HIV-MA an Position 60 von Mia2)



pHM-6n (30 AS HIV-MA an Position 28 von Mia2)



### Abb. 9) Schematische Darstellung der HIV-MA-IAP-Konstrukte

Dargestellt sind die Konstrukte HM-1n mit HIV-MA, fusioniert an die *NheI* Schnittstelle an Position 1230 des Mia2 Plasmids und die daraus klonierten Konstrukte Konstrukte HM-2n, HM-4n, HM-5n und HM-6n. Die Klonierung dieser Konstrukte ist im Text beschrieben.

Tab 1) Primer

Name	Sequenz	Richtung	Besonderheit
FKBP-1,s	5' gca cca tgg cgg ccg gcg tgc agg tgg aaa cc	sense	<i>NcoI-EagI</i>
FKBP-1,r	5' ggc gct agc tgg cca agg gcc cct cct tcc agt ttt agc agc tcc aca tcg	rev.	
nef13	5' agc gaa ttc atg acg cca gcg ccg gct agc cca atc aca cta ctt ttt gac c	rev.	<i>NgoMI-NheI</i>
GFP (06698)	5' t cag cgg ccg cct tgt aca gct cgt cca tgc c	rev.	Sequenzier- Primer
M13	5' cccagtcacgacgttgtaaacg	sense	Sequenzier- Primer

### 2.3. Arbeiten mit Säugetierzellen

#### 2.3.1. Zellkulturmaterialien

##### Reagentien für die Zellkultur:

Pulvermedien, Trypsin, Glutamin und Antibiotika wurden von Life Technologies GmbH (Eggenstein) bezogen. Fötale Kälberserum stammte von PAA (Linz, Österreich) Dimethylsulfoxid (DMSO) von Serva (Heidelberg).

##### Zur Kultivierung der Zellen wurden folgende Medien und Zusätze verwendet:

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Minimum Essential Medium

Das synthetische Medium wurde vor dem Gebrauch mit folgenden Zusätzen versetzt: 10% FKS (Fötale Kälberserum, wärmebehandelt für 30 min bei 56°C), 100 IU/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin und 2mM Glutamin.

Einfriermedium für Zellen: FKS 50%, DMSO 10% und DMEM 40%.

PBS (Phosphate Buffered Saline): NaCl 9 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH [7.3]

Lösungen für die Kalziumphosphat Transfektion (Chen und Okayama 1987):

CaCl<sub>2</sub>-Lösung: 250mM CaCl<sub>2</sub> (Sterilisiert durch Filtration)

2xBBS-Lösung: 50mM BES, 280mM NaCl, 1,5mM Na<sub>2</sub>HPO [pH 6.95] (Sterilisiert durch Filtration)

### 2.3.2. Zellen und deren Kultivierung

#### Adhärenz wachsende Zelllinien:

- COS7: Mit SV40 T-Antigen transformierte Affen-Nierenepithel Zelllinie, die sich durch gute Transfizierbarkeit auszeichnet.
- Hela P4-CCR5: Hela Zelllinie, die den CD4-Rezeptor und die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 exprimieren, sowie das Gen für Betagalaktosidase unter der transkriptionellen Kontrolle des HIV-1 LTR enthält. Diese Zelllinie ist durch HIV-1 gut transfizierbar und zeichnet sich durch hohe Proteinexpression, gute Adhäsion und Zellausbreitung aus (Kimpton u. Emerman, 1992).
- 293T: eine durch Adenovirus immortalisierte, humane, fötale Nierenepithel-Zelllinie, die mit SV40 T-Antigen stabil transformiert wurde. Diese Zelllinie zeichnet sich durch besonders gute Transfizierbarkeit und hohe Proteinexpression aus.

#### Zellkultur

Die adhärenz wachsenden Zellen wurden in DMEM, versetzt mit FKS, Glutamin und Antibiotika, bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Passagierung wurden COS7, Hela P4-CCR5 und 293T Zellen nach Waschen mit Trypsin/EDTA vom Boden des Gefäßes abtrypsiniert und je nach Bedarf auf neue Kulturgefäße in frischem Medium verdünnt.

### 2.3.3. Transfektion von Säugetierzellen

1-5 x 10<sup>6</sup> COS7 bzw. Hela P4 Zellen wurden auf eine 10 cm Schale ausgesät, so daß die Zellen möglichst vereinzelt vorlagen. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch genau 9 ml frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 1 bis 2 Stunden wieder in den Inkubator gestellt. 15-20 µg DNA wurden in 500 µl 0,25M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gelöst und danach sofort mit 500 µl 2 x BBS (siehe oben) sorgfältig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15-20 min bei Raumtemperatur wurde dieses Gemisch unter Schwenken der Zellkulturschale ins Medium getropft. Die Zellen wurden über Nacht bei 35°C in einer Atmosphäre von 3% CO<sub>2</sub> und gesättigtem Wasserdampf inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium verworfen, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 10 ml frischem Medium für ein bis drei Tage, abhängig vom transfizierten Plasmid, in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Transfektion der 293T-Zellen erfolgte wie bereits für COS7 und Hela P4-Zellen beschrieben. Transfiziert wurde mit einer Lösung bestehend aus 15-20  $\mu$ g DNA, 500  $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$  und 500  $\mu$ l 2 x HEPES. Erst kurz vor Zugabe des Transfektionsmixes wurde der Mediumwechsel vorgenommen. Einen Tag nach Waschen mit PBS wurde erneut das Medium gewechselt und die Zellen drei weitere Tage im Zellinkubator belassen. Zellen und Überstände wurden je nach Experiment weiter verwendet.

### **Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Die Zahl der transfizierten Zellen in einem Ansatz ist kritisch für die nachfolgenden biochemischen Analysen. Deshalb wurde nach jeder Transfektion die Zahl der transfizierten Zellen bestimmt. Hierzu wurden beim Ausplattieren der Zellen durch Abflammen sterilisierte mikroskopische Deckgläschen in die Kulturschale gegeben, auf denen die Zellen angewachsen sind. Am Tag der "Ernte" wurden die Deckgläschen fixiert und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf die Expression von Proteinen hin analysiert.

Alternativ wurden die Zellen mit einem Expressionsplasmid, das für „Grün Fluoreszierendes Protein“ (GFP) kodiert, transfiziert (Übersichtsartikel Prasher, 1995). Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, die GFP-Expression an der lebenden Zelle zu verfolgen. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde entweder grob quantitativ, durch Beurteilung der 10 cm Schale im inversen Fluoreszenzmikroskop, oder, nach Fixierung eines Deckgläschens mit 3,7% Formaldehyd, im lichtstärkeren aufrechten Fluoreszenzmikroskop, durch Auszählen GFP-positiver Zellen, durchgeführt.

### **Inkubation der Zellen mit dem „Dimerizer“ AP1510**

Für die Analyse der Zellen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop wurden die Deckgläschen mit den adhärent wachsenden Zellen der Zellkulturschale entnommen, kurz mit PBS gewaschen und mit 50  $\mu$ l Medium und 1nM AP1510 für einen festgelegten Zeitraum in einer feuchten Kammer bei 5%  $\text{CO}_2$  und 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Deckgläschen in eiskaltem PBS gewaschen, um den Dimerisierungsvorgang zu stoppen. Anschließend wurden die Zellen fixiert.

Um die Zellextrakte und Überstände nach „Dimerizer“-Inkubation im Immunoblot zu analysieren, wurden Hela P4 Zellen in einer 10 cm Schale ausplattiert und transfiziert, wie im Transfektionsprotokoll beschrieben. Einen bzw. zwei Tage nach Mediumwechsel wurde das gesamte Medium verworfen, die Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen und danach 4 h mit 1 ml Medium und 1  $\mu$ M AP1510 bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Das

Medium wurde anschließend vollständig abgenommen und bei 4°C zwischengelagert. Die Zellen wurden bei -20°C für die Immunoblot Analyse aufbewahrt.

### **Pelletierung von Viruspartikeln für biochemische Analysen**

Hela P4-CCR5, COS7 und 293T Zellen wurden wie beschrieben transfiziert. 24h nach Transfektion von Hela P4 Zellen bzw. 48 h nach Transfektion von COS7 oder 293T Zellen (Expressionseffizienz wurde vorher durch Immunfluoreszenz überprüft) wurde das Medium abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Die Partikel konnten dann in der Ultrazentrifuge, unter Verwendung eines Ausschwing-Rotors (je nach Volumen, Beckmann, Typ SW41 oder SW28 bzw. Tischultrazentrifuge, Beckman, Typ TLA 100.2) durch ein Kissen aus 20% Saccharose in PBS (2 ml für SW41, 5 ml für SW28 und 200 µl für TLA 100.2) bei 30000 rpm sedimentiert werden. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Viruspartikel im Pellet in PBS resuspendiert, in ein kleines Gefäß transferiert und bis zur Analyse bei -20°C weggefroren.

## **2.4. Biochemische Analyse von viralen Genprodukten**

### **2.4.1. Lösungen und Puffer**

#### **Für die indirekte Immunfluoreszenz:**

Methanol/Aceton-Fixierung: Methanol -20°C, Aceton -20°C, Verhältnis 1:1

Formaldehyd-Fixierlösung: 3,7% Formaldehyd, 0,1% Glutaraldehyd in PBS;

Aufbewahrung: bei 4°C

Paraformaldehyd-Fixierlösung: 3% Paraformaldehyd in PBS;

Aufbewahrung: bei 4°C

Blocking-Lösung: 50mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS;

Aufbewahrung: bei RT

#### **Für die Gelelektrophorese:**

Laufpuffer für Proteingele: Glycin 0,348M, Tris-Base 0,05M, SDS 0,1%

5 x Ladepuffer für Proteingele: Glycerin 40%, SDS 10%, DTT 0,25M, Tris-HCl [pH 6.8] 0,125M, Bromphenolblau 0,01%

**Für Immunoblot Analysen:**

Western-Blot Transferpuffer:

- b) Tris-Base 0,3M, Methanol 20%
- c) Tris-Base 0,025M, Methanol 20%
- d) Tris-Base 0,025M, DL-Norleucin 0,040M, Methanol 20%

Ponceau-S Rot: 0,1% Lösung in 5% Essigsäure

PBS (Phosphate Buffered Saline): NaCl 9 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,21 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Reagentien für die Detektion mit Alkalischer Phosphatase:

Western Blot Blocking-Puffer: 10% Magermilchpulver in PBS

Western Blot Waschpuffer: PBS mit 1% Triton-X 100

AP Puffer: 50 mM Glycin/NaOH [pH 9.6], 4mM  $\text{MgCl}_2$

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat): 5 mg/ml in Dimethylformamid (DMF).

Aufbewahrung: lichtgeschützt bei  $-20^\circ\text{C}$

NBT (4-Nitro blau Tetrazolium Chlorid): 10 mg/ml in 70% Dimethylformamid.

Aufbewahrung: lichtgeschützt bei  $-20^\circ\text{C}$

Reagentien für die Detektion mittels ECL:

ECL-Kit, Amersham (Braunschweig) bzw.

ECL mit selbsthergestellten Lösungen: 2,5mM Luminol in DMSO, 200  $\mu\text{M}$  Paracoumaric acid in DMSO, 5,4mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100mM Tris-HCl [pH 8.5]

TBS (Tris Buffered Saline): 20mM Tris-HCl [pH 7.5], 150mM NaCl

TBS/Tween 0,05%: TBS mit 0,05% Tween 20

TBS/Tween 3%: TBS mit 3% Tween 20

Röntgenfilme: Kodak X-AR, Hypermax-beta (Amersham)

**2.4.2. Antikörper****Präabsorbieren von Antiseren**

Bei Reaktivität von primärem und sekundärem Antikörper mit den Zielzellen wurden die Antiseren präabsorbiert. Dazu wurden COS7 und Hela P4-CCR5 Zellen nach dem Passagieren auf mehrere 10 cm-Schalen aufgeteilt in einer Zelldichte zwischen  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6/\text{ml}$ . Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit

PBS gewaschen und anschließend 10 min mit 5 ml 3%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Nach erneutem gründlichen Waschen mit PBS wurden die Zellen 15 min mit derselben Menge 50mM NH<sub>4</sub>Cl blockiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzudecken, folgte eine 15 minütige Inkubation der Zellen mit 5 ml 1% BSA in PBS. Nachdem diese 5 ml wieder komplett entfernt waren, wurden 2 ml des  $\square$ -HIV-CA-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:10 in 1% BSA in PBS auf die Schalen gegeben. Die Schalen wurden sorgfältig mit Parafilm verschlossen und auf einer Wippe 3 h bei RT inkubiert. Im Anschluß an die 3 h Inkubation wurde der Überstand so vollständig wie möglich entfernt, auf 2 ml Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt und 10 min bei 15000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 500  $\square$ l Alliquots bei -20°C aufbewahrt.

**Tab 2) Spezifische Erstantikörper**

	Spezies	Bezugsquelle	WB/AP	WB/ECL	IF	EM
$\square$ -HIV-CA präabsorbiert	Kaninchen		-	-	1:10	-
$\square$ -HIV-CA	Kaninchen	Prof. Kräusslich	1:2500	1.5000	1:100	1:500
$\square$ -IAP	Kaninchen	Dr. Kira Lueders (NIH)	1:2000	1:8000	1:100	-
$\square$ -PO 1.1	Maus	Dr. Wiegers	1:1000	-	-	-
$\square$ -HA	Maus	Böhringer Mannheim	-	1:80	1:50	1:50

**Tab 3) Spezifische Zweitantikörper**

Spezifität	Spezies	Marker	WB/AP	WB/ECL	IF	EM
$\square$ -Kaninchen	Ziege	Alkalische Phosphatase	1:5000	-	-	-
$\square$ -Kaninchen	Esel	Merrettich Peroxidase	-	1:10000	-	-
$\square$ -Maus	Ziege	Alkalische Phosphatase	1:5000	-	-	-
$\square$ -Maus	Ziege	Merrettich Peroxidase	-	1:10000	-	-
$\square$ -Kaninchen	Esel	FITC	-	-	1:100	-
$\square$ -Maus	Esel	Texas Red	-	-	1:50	-
$\square$ -Mensch	Ziege	DTAF	-	-	1:100	-
$\square$ -Kaninchen		Gold-Partikel 6nm	-	-	-	1:20

□-Kaninchen		Gold-Partikel 12nm	-	-	-	1:20
□-Maus		Gold-Partikel 12nm	-	-	-	1:20

Polyklonale Sekundärantikörper mit Detektionsmarker wurden von Dianova (Hamburg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

**Tab. 2 und 3) Zur Analyse verwendete Antikörper**

Auflistung der Verdünnungen der einzelnen Antikörper für Western Blot (WB)/Immuno Blot bei Nachweis mittels Alkalischer Phosphatase (AP) oder ECL, indirekter Immunfluoreszenz (IF) und Elektronenmikroskopie (EM)

**2.4.3. Methoden für die Analyse von Proteinen**

**Indirekte Immunfluoreszenz**

Auf mikroskopischen Deckgläschen wachsende adhärenente Zellen wurden nach Waschen mit PBS bei RT für 10 min mit 3%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, anschließend mehrmals mit PBS gewaschen und weitere 15 min mit NH<sub>4</sub>Cl blockiert. Bis zur Immunfärbung wurden die Zellen in PBS bei 4°C aufbewahrt.

Vor der Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Zellen 5 min mit 0.1% Triton-X 100 in PBS permeabilisiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 15 min mit 1% BSA in PBS überschichtet und bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Auf ein kurzes Waschen mit PBS folgte eine 60 minütige Inkubation mit dem Erstantikörper in 1% BSA in PBS bei 37°C in der feuchten Kammer. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte wie in Tabelle 2 dargestellt. Danach wurde wieder mit PBS gründlich gewaschen und zur Detektion mit dem Zweitantikörper analog inkubiert. Die Präparate wurden feucht mit Elvanol eingebettet und im Mikroskop (Zeiss, Axiophot) analysiert.

Diese Methode wurde hauptsächlich zum Nachweis der Expression von HIV-Proteinen bzw. FKBP-IAP-Fusionsproteinen in Hela P4-CCR5 Zellen angewandt.

Wie für die Paraformaldehyd-Fixierung beschrieben, wurde bei der Formaldehyd-Fixierung 10 min mit Formaldehyd fixiert und 15 min mit NH<sub>4</sub>Cl blockiert. Es wurde keine Immunfärbung der Zellen durchgeführt, sondern die Zellen sofort nach Beendigung des Fixiervorgangs mit Elvanol eingebettet. Diese Art der Fixierung eignete sich zum Nachweis von GFP und GFP-Fusionsproteinen.

Die Methanol-Aceton-Fixierung wurde nach Waschen der Zellen mit PBS bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für je 10 min zuerst mit Methanol, dann mit Aceton durchgeführt und die Zellen danach getrocknet. Die getrockneten Zellen konnten direkt für die Immunfärbung verwendet werden. Mit der Methanol-Aceton-Methode wurden COS7-Zellen fixiert und die Expression von IAP-Proteinen nachgewiesen.

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Proteinanalyse wurde eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Verwendet wurden dabei 17,5%ige Trenngele (Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid 200:1) und 6,3%ige Sammelgele (Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid 40:1). Vor dem Auftragen wurden die Proben für 10 min in Proteinladepuffer gekocht. Es wurden Minigele (Größe 9 x 7 x 0,15 cm; System 201, Hoefer, San Francisco, USA) verwendet und die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke durchgeführt (20 mA im Sammelgel und 40 mA im Trenngel).

### **Immuno-Blot/Western-Blot (Towbin et al., 1979)**

Nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mit einer „Semi-dry“ Trans-Blot Apparatur (cti GmbH) bei 220 mA für 45 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll) übertragen. Die Übertragungseffizienz wurde durch Färbung mit Ponceau-S (Sigma) überprüft. Nach Entfärbung mit PBS wurde die Nitrozellulose zur Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen für 30 min in 10% Magermilchpulver in PBS inkubiert. Die spezifischen Antikörper wurden in PBS mit 1% Magermilchpulver und 0,5% Triton-X 100 verdünnt und für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Überkopf-Schüttler mit der Nitrozellulose inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Nitrozellulose mit PBS/0,5% Triton-X 100 erfolgte die Inkubation mit dem enzymmarkierten Zweitantikörper.

Für den Nachweis durch eine Alkalische-Phosphatase vermittelte Farbreaktion wurden die Zweitantikörper analog dem ersten Antikörper mit der Nitrozellulose inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS/Triton erfolgte die Farbreaktion mit BCIP und NBT als Substrat bei pH 9.6.

Für eine erhöhte Sensitivität beim Nachweis der Proteine wurde eine enzymvermittelte Chemolumineszenzreaktion (ECL) verwendet. Dazu wurden sowohl Erst-, als auch Zweitantikörper bei einer wesentlich höheren Verdünnung eingesetzt als zum Nachweis mittels Alkalischer Phosphatase. Nach Inkubation der Nitrozellulose mit dem Peroxidase

gekoppelten Zweitantikörper wurde intensiv mit TBS/Tween gewaschen. Die Lumineszenzreaktion wurde durch Inkubation des Blots mit ECL-Kit von Amersham bzw. der selbsthergestellten ECL-Lösung gestartet und die Proteine wurden durch Exposition von Röntgenfilmen nachgewiesen.

### **Elektronenmikroskopische Analyse**

Die elektronenmikroskopischen Analysen wurden von Dr. G. Rutter durchgeführt.

24 h nach Transfektion wurden die Zellen dreimal mit PIPES (Piperazine-1,4-bis(2-Ethanesulfonic-Säure); [pH 6.9]) gewaschen und anschließend für 20 min in kaltem 2,5%igem Glutaraldehyd in 100mM PIPES fixiert. Die fixierten Zellen wurden danach von der Platte geschabt und durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit gesammelt. Anschließend wurde dreimal mit kaltem PIPES gewaschen und für 30 min mit 1% Osmiumtetroxid in PIPES bei 4°C inkubiert. Nach ausführlichem Waschen mit PIPES wurden die Zellen in Agarose eingebettet (niedrige Geliertemperatur, Sigma) und nachfolgend 10 min mit 1% Tanninsäure behandelt und in Agar-Blöcke geschnitten. Abschließend wurden die Agar-Blöcke in Wasser gewaschen, 30 min bei 4°C mit 1% Uranylazetat gefärbt, in Ethanol dehydriert und in ERL-Harz eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem Philips CM120-Elektronenmikroskop bei 60 kV untersucht.

### **Immunoelektronenmikroskopische Analyse**

Für die immunoelektronenmikroskopische Analyse wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PIPES-Puffer gewaschen und in Petrischalen für 30 min mit einer Lösung aus 4% Formaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd in PIPES fixiert. Die Zellen wurden mit 1%igem Osmiumtetroxid in PIPES behandelt, in Agarose eingebettet und in 2% Uranylacetat (gelöst in Wasser) für 30 min bei 4°C inkubiert. Das Material wurde in Ethanol dehydriert und anschließend nach der London Resin White Methode in Gelatine-Kapseln eingebettet. Diese wurden 24 h bei 60°C polymerisiert und mit einem Diamantmesser geschnitten. Die Schnitte wurden auf Nickel-Grids aufgebracht und mit 1-3% Natriumperjodat für 10-15 min geätzt. Danach wurde gründlich gewaschen.

Die Inkubation mit den beiden Erstantikörpern  $\square$ CA oder  $\square$ HA bzw. bei Co-Transfektion mit beiden Antikörpern gleichzeitig in 10mM TrisHCl/5M NaCl wurde über Nacht mit einer Konzentration von  $\square$ CA 1:500 und  $\square$ HA 1:50 durchgeführt. Geblockt wurde mit BSA 1% und Fisch-Gelatine 3% in TBS für 10 min. Danach wurde 3 x 5 min mit TBS gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:20 inkubiert. Der

Zweitantikörper war mit Gold-Partikeln markiert, die in der Größe □Rabbit 6 nm/12 nm und □Mouse 12 nm vorlagen. Nach der Inkubation wurden die Schnitte wieder mit TBS gewaschen. Außerdem wurde abschließend je 5 min mit Uranylacetat und Bleiacetat gefärbt und zwischendurch mit destilliertem Wasser gewaschen.

Nach Einbettung in ERL-Harz wurden die Schnitte mit einem Philips CM120-Elektronenmikroskop bei 60 kV untersucht.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Kartierung des Membrantransportsignals in HIV-Matrix mit Hilfe von chimären HIV-IAP-Gag-Proteinen**

##### **3.1.1. Membrantransportdomänen in HIV und in murinen Intrazisternalen A-Typ Partikeln (IAP)**

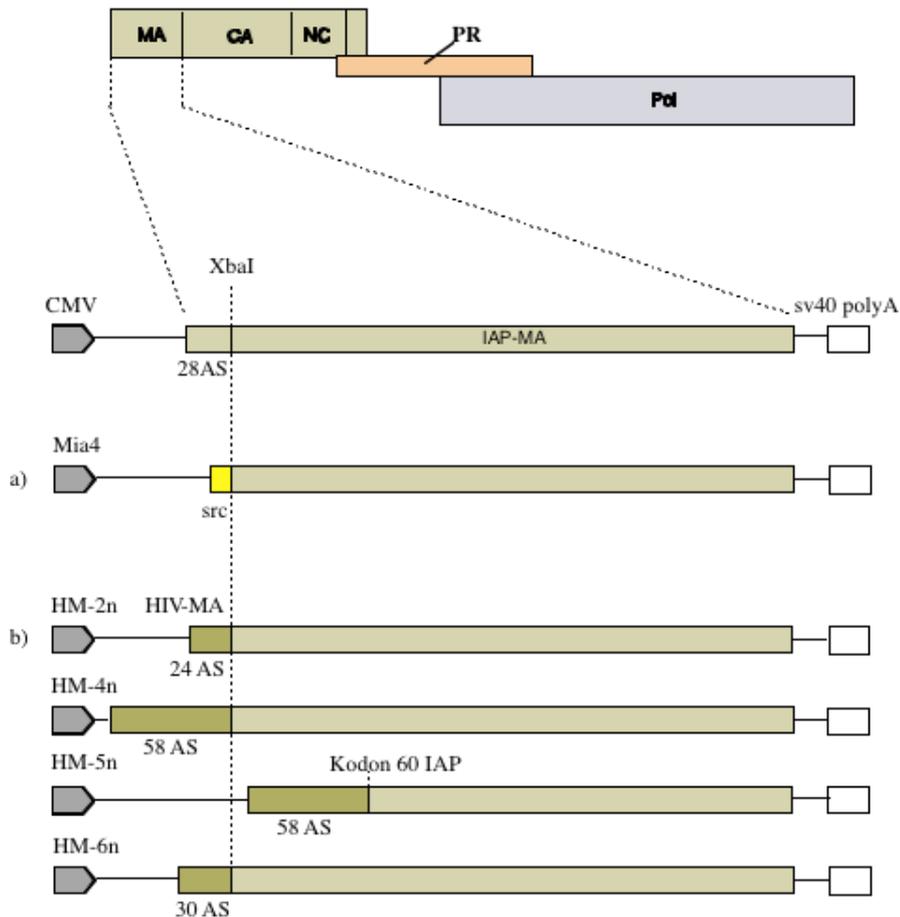
Die Myristilierung der N-terminalen HIV-MA-Domäne, sowie eine N-terminale Region aus ca. 30 zum Teil basischen Aminosäuren, sind essentiell für den spezifischen Transport der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine zur Plasmamembran (zusammengefaßt von Kräusslich und Welker, 1996). Bei den murinen Intrazisternalen A-Typ Partikeln dirigiert ein N-terminal gelegenes Signalpeptid aus 28 Aminosäuren die Zusammenlagerung der viralen Strukturproteine an die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (siehe Einleitung). Durch Mutationen innerhalb des Signalpeptids läßt sich dieser Transportweg beeinflussen. Eine Deletion führt zu einer zytosolischen Lokalisation der IAP-Gag-Proteine. Wird das Signalpeptid durch ein heterologes Transportsignal ersetzt, wie z.B. durch das des Src-Proteins, führt dies zum Transport der viralen Gag-Proteine an die Plasmamembran und zur Freisetzung viraler Partikel (Welker et al., 1997).

Um den Einfluß der Transportdomäne des HIV-MA-Proteins auf den spezifischen Membrantransport und die Partikelbildung näher zu charakterisieren, wurden Plasmidvektoren für Chimäre aus unterschiedlich langen Sequenzen von HIV-MA und dem murinen IAP (Mia2-Plasmid) konstruiert.

##### **3.1.2 Klonierung der chimären HIV-IAP-Proteine**

Anstelle der ersten 28 Kodons des IAP-Plasmids (Mia2) wurden HIV-MA-Sequenzen bestehend aus 24 Kodons (HM-2n), 30 Kodons (HM-6n) bzw. 58 Kodons (HM-4n) des N-Terminus eingesetzt (Abb. 10). Ein weiteres Konstrukt bestand aus 58 Kodons von HIV-MA, die ähnlich dem Plasmid HM-4n an Kodon 60 des Mia2-MA fusioniert waren (HM-5n). Als Kontrolle dienten die Plasmide Mia2 mit der Wildtyp-Sequenz des Virus, und Mia4, in welchem die ersten 28 Kodons durch das Myristilierungssignal des Src-Proteins ausgetauscht worden waren (Abb. 10, Welker et al., 1997). Um zu untersuchen, ob eine eventuell zu

beobachtende Spaltung der chimären Gag-Proteine spezifisch durch die IAP-Protease (PR) oder durch eine zelluläre Protease erfolgte, wurde im Falle der Plasmide HM-2n, HM-4n und HM-5n zusätzlich eine inaktivierende Punktmutation im aktiven Zentrum der Protease eingefügt. Bei dieser Punktmutation handelt es sich um einen Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Alanin. Diese Konstrukte wurden als HM-2an, HM-4an und HM-5an bezeichnet.



#### Abb. 10) Schematische Darstellung der HIV-MA-IAP-Chimäre

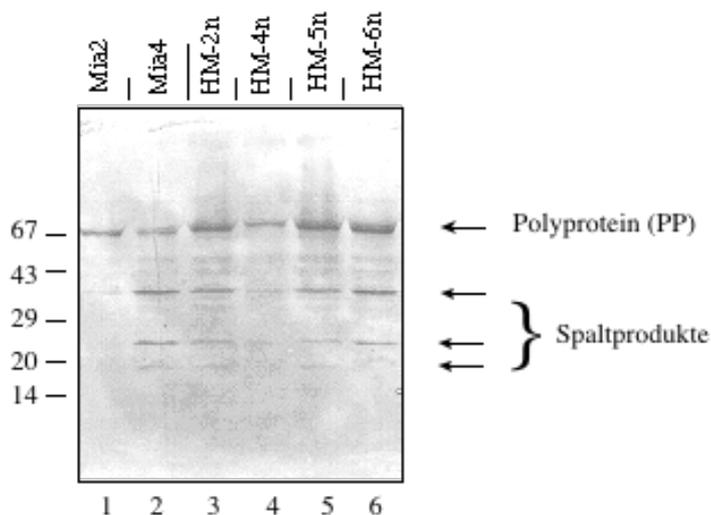
Die Abbildung zeigt den Wildtyp und verschiedene IAP-Mutanten. Oben sind die kodierenden Regionen von Wildtyp-IAP14 (Plasmid Mia2) dargestellt. **a)** zeigt das Konstrukt Mia4, mit dem Austausch der N-terminal gelegenen 28 hydrophoben AS gegen das Membrantransportsignal des Src-Proteins (Welker et al., 1997). **b)** Darstellung der Konstrukte, bei denen verschiedene lange HIV-MA-Sequenzen an Kodon 29 (HM-2n, HM-4n, HM-6n) bzw. Kodon 60 (HM-5n) fusioniert wurden. In der Abbildung sind die Anzahl der N-terminalen Kodons von HIV-MA angegeben.

#### 3.1.3. Nachweis der HIV-IAP-Fusionsproteine

Zur Überprüfung der Stabilität der HIV-IAP-Fusionsproteine wurden COS7 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Anschließend wurden die Proteine der Zellysate über

Ergebnisse

ein SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 11) und die chimären HIV-IAP-Gag-Proteine wurden mittels Western Blot unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums gegen IAP detektiert. Dabei ließ sich für alle Konstrukte das IAP-Gag bzw. das chimäre HIV-IAP-Gag-Polyprotein (ca. 67 kDa) nachweisen. Die Transfektion der für die chimären HIV-IAP-Fusionsproteine kodierenden Plasmide ergab neben dem Gag-Polyprotein weitere virale Proteine mit einer Größe von 35, 24 und 20 Kilo-Dalton (kDa) im Western Blot (Abb. 11). Bei diesen Proteinen handelt es sich wahrscheinlich um Spaltprodukte der viralen Protease (siehe unten).



#### Abb. 11) Western Blot Analyse von chimären HIV-IAP-Proteinen

48 Stunden nach transienter Transfektion von COS7 Zellen mit dem über der jeweiligen Spur angegebenen Plasmid wurden die entsprechenden Zellysate im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Expression von Wildtyp- und chimären HIV-IAP-Gag-Proteinen wurde mittels Western Blot unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchenserums gegen IAP-Gag analysiert. Der Nachweis der immunreaktiven Proteine erfolgte mit einem an Alkalische Phosphatase gekoppelten Zweitantikörper und einem chromogenen Substrat (BCIP/NBT). Links ist das Molekulargewicht in Kilo-Dalton (kDa) angegeben. Die Pfeile rechts deuten auf die Position relevanter Proteine.

#### 3.1.4. Analyse der subzellulären Lokalisation der chimären HIV-IAP-Proteine

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation der chimären HIV-IAP-Gag-Proteine innerhalb der Zelle analysiert. Dazu wurden COS7 Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transient transfiziert. Der Nachweis erfolgte wiederum mit einem polyklonalen Antiserum gegen das murine IAP (Abb. 12).

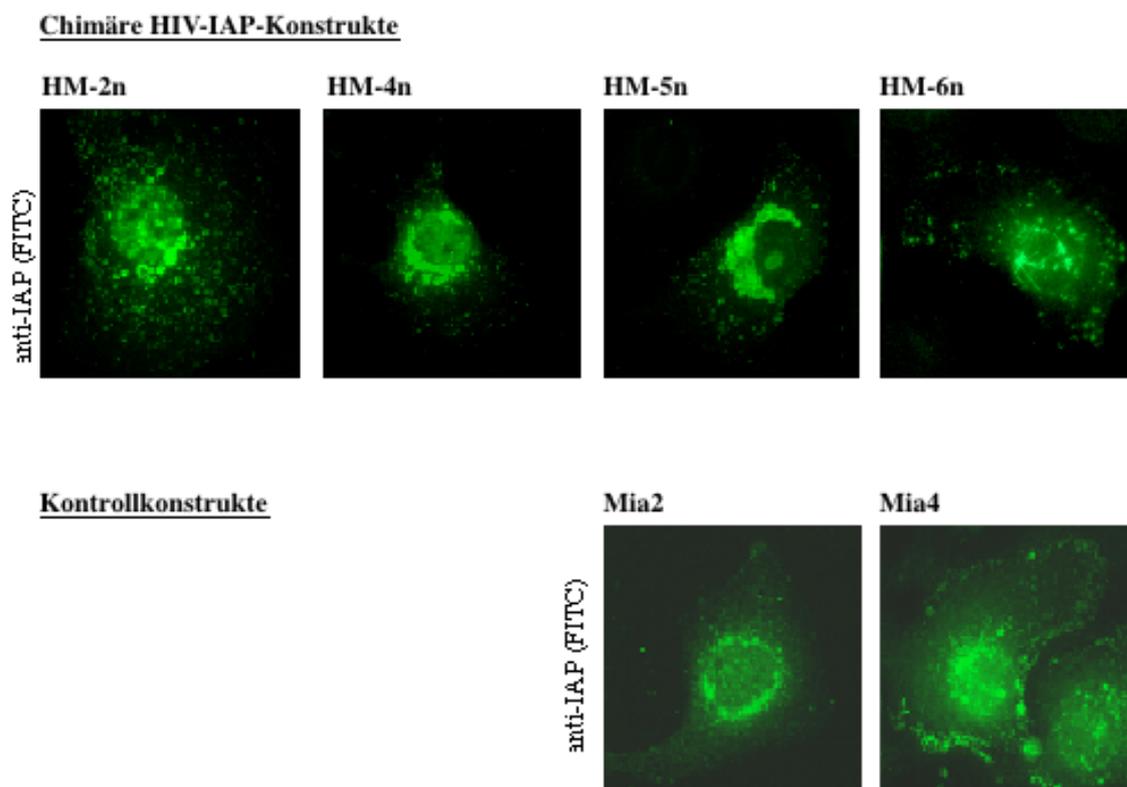
Nach Transfektion von Mia2 zeigte sich nach Expression der Wildtyp-Proteine eine intrazytoplasmatische Fluoreszenzanreicherung mit perinukleärer Akkumulation. Für das

Kontrollplasmid Mia4, das anstelle des IAP-Signalpeptids für ein N-terminales Membrantransportsignal des Src-Proteins kodiert (Abb. 12, unten), ließ sich ebenfalls eine deutliche Fluoreszenzanreicherung perinukleär nachweisen. Darüber hinaus zeigte sich eine spezifische Verteilung der Fusionsproteine an der Plasmamembran.

Ein ähnliches Verteilungsmuster wie die Wildtyp-Proteine (Mia2) zeigten die chimären HIV-IAP-Gag-Proteine nach Transfektion von HM-2n-, HM-4n- und HM-5n. Allerdings fand sich neben perinukleärer Akkumulation (Abb. 12, oben) zusätzlich eine Fluoreszenzüberlagerung des Zellkerns, speziell nach Transfektion von HM-2n und HM-4n. Dieses Phänomen war weder in den mit HM-5n noch in den mit HM-6n transfizierten Zellen zu beobachten. Das HM-6n-Konstrukt unterschied sich von allen anderen Konstrukten durch eine spezifische Fluoreszenzanreicherung der resultierenden Fusionsproteine an der Plasmamembran und an der Kernmembran (Abb. 12).

Die Plasmide HM-2an, HM-4an und HM-5an kodierten für eine Punktmutation im aktiven Zentrum der viralen Protease. Phänotypisch waren keine Unterschiede in der subzellulären Lokalisation dieser chimären HIV-IAP-Proteine im Vergleich zur Proteinexpression nach Transfektion der entsprechenden Konstrukte ohne Mutation zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Mit zunehmender Länge der an IAP-Gag fusionierten HIV-MA-Domäne nimmt offensichtlich die Membrantransportkapazität zu. So ändert sich die subzelluläre Lokalisation der HIV-IAP-Fusionsproteine von partiell intranukleär und zytoplasmatisch (HM-2n und teilweise HM-4n) zu vollständiger Aussparung des Zellkerns und perinukleärer Akkumulation (HM-5n). Eine spezifische Verteilung der Proteine an der Plasmamembran, wie sie für Mia4 beschrieben ist, war allerdings für keines der chimären HIV-IAP-Gag-Proteine zu beobachten.



**Abb. 12) Subzelluläre Lokalisation der HIV-MA-IAP-Fusionsproteine**

48 h nach transienter Transfektion der Plasmide in COS7 Zellen wurde die subzelluläre Lokalisation der chimären HIV-IAP-Proteine über indirekte Immunfluoreszenz mit einem polyklonalen Antiserum gegen IAP nachgewiesen. Im oberen Teil der Abbildung sind die Fusionsproteine aus der Transfektion der Konstrukte HM-2n, HM-4n, HM-5n und HM-6n dargestellt, im unteren Teil der Abbildung die Proteinexpression der Kontrollen Mia2 und Mia4.

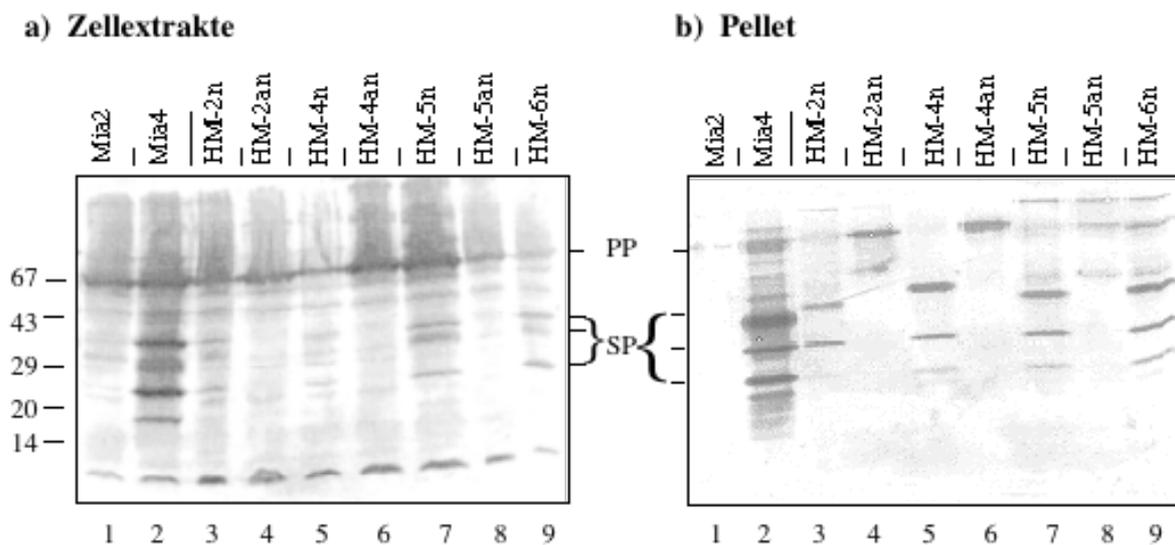
**3.1.5. Nachweis von Partikelbildung und -freisetzung aus der Zelle**

Die Transfektionseffizienz in COS7 Zellen war zu gering für die Analyse der viralen Proteine im Überstand (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die beschriebenen Konstrukte in 293T-Zellen exprimiert (Abb. 13). Die dabei erzielten Ergebnisse entsprachen denjenigen aus der Transfektion von COS7 Zellen, mit der Ausnahme, daß die Expression der viralen Proteine deutlich höher war.

Die jeweils nebeneinander aufgetragenen Zellysate aus den Transfektionen der HIV-IAP-Gag-Konstrukte, die für aktive bzw. inaktive Protease kodieren, zeigten eine partielle Spaltung der viralen Polyproteine für alle Konstrukte ohne die beschriebene Punktmutation im aktiven Zentrum der viralen Protease (Abb. 13a). Die Größe der Spaltprodukte entsprach den erwarteten ca. 35, 24 und 20 kDa. Eine Ausnahme bildete der Wildtyp (Mia2), bei dem trotz intakter Protease keine Prozessierung stattgefunden hatte (Abb. 13a/1, siehe Abschnitt 3.1.1.). Bei dem Konstrukt Mia4 ließen sich ebenfalls spezifische Spaltprodukte nachweisen

(Abb. 13a/2). Diese entsprachen in ihrer Größe den Spaltprodukten aus den Transfektionen der chimären HIV-IAP-Gag-Konstrukte. Bei den Plasmiden mit einer Punktmutation im aktiven Zentrum der viralen Protease fanden sich neben dem viralen Gag-Polypeptid keine weiteren Proteine.

Um zu analysieren, ob virusähnliche Partikel gebildet und aus den Zellen freigesetzt worden waren, wurde partikuläres Material aus den Zellüberständen in der Ultrazentrifuge pelletiert. Nach Pelletierung konnten Spaltprodukte der viralen Polyproteine im Falle der Konstrukte HM-2n, HM-4n, HM-5n und HM-6n in der jeweiligen Partikelfraktion nachgewiesen werden (Abb. 13b). Bei den entsprechenden Plasmiden mit inaktiver viraler Protease (HM-2an, HM-4an, HM-5an) waren ausschließlich Gag-Polypeptide und keine Spaltprodukte nachweisbar. In Überständen von Zellen, die mit Mia2, dem Wildtyp, transfiziert worden waren, ließen sich keine IAP-Gag-Proteine nachweisen (Abb. 13b/1). Mia4 zeigte ein deutlich stärkeres Signal als alle anderen Konstrukte. Besonders auffällig war in diesem Fall die große Menge an extrazellulär nachweisbaren Gag-Spaltprodukten.



**Abb. 13) Vergleich der Bildung und Freisetzung viraler Partikel nach Transfektion der chimären HIV-IAP-Konstrukte mit aktiver und inaktiver Protease in 293T-Zellen**

**a)** 48 Stunden nach transients Transfektion von 293T-Zellen wurden die Zellextrakte der HIV-IAP-Konstrukte lysiert und die viralen Proteine mittels Western Blot mit einem polyklonalen Antiserum gegen IAP nachgewiesen. **b)** Die Zellüberstände wurden bei 30.000 rpm in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert und die Pellets mittels Western Blot mit einem polyklonalen Antiserum gegen IAP analysiert. In Spur 1 und 2 sind die Kontrollen Mia2 und Mia4 dargestellt. Spur 3 bis 9 zeigt jeweils die einzelnen HIV-IAP-Konstrukte mit aktiver und inaktiver Protease.

Der Vergleich der zellulären Gag-Proteine und der durch Pelletierung im Überstand nachgewiesenen viralen Proteine zeigte, daß die freigesetzten Gag-Proteine nahezu

vollständig prozessiert waren. Durch den funktionellen Austausch der ersten 28 Aminosäuren von IAP-Gag mit der N-terminalen HIV-MA-Domäne war offensichtlich ein unspezifischer Transport an zelluläre Membranen induziert worden. Durch die vermutlich hohe Konzentration von an intrazelluläre Membranen gebundenen Gag-Proteinen, war die Konzentration der extrazellulär nachweisbaren Gag-Proteine nur gering. In der Transfektion des Kontrollkonstrukts Mia4 zeigte sich, daß durch das Membrantransportsignal des Src-Proteins eine deutlich spezifischere Plasmamembranbindung erreicht werden kann.

### **3.1.6. Bedeutung der N-terminalen HIV-MA-Domäne für den Membrantransport**

In der Immunfluoreszenz erkennt man eine starke perinukleäre Akkumulation der chimären HIV-IAP-Gag-Proteine. Dieses Ergebnis läßt darauf schießen, daß es überwiegend zu einem Transport der chimären Gag-Proteine an intrazelluläre Membranen gekommen sein muß. Der Nachweis extrazellulärer viraler Gag-Spaltprodukte in der Western Blot Analyse deutet allerdings darauf hin, daß neben der Bindung an intrazelluläre Membranen auch ein Transport an die Plasmamembran stattgefunden hat.

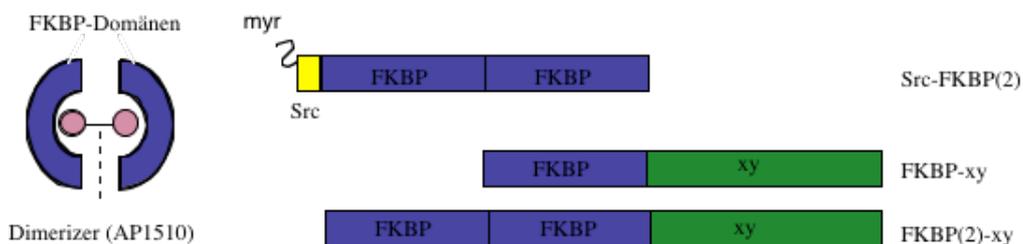
Da bereits kleine Mutationen in HIV-MA die Tertiärstruktur des Proteins verändern können und auf diese Weise die Membrantransporteigenschaften des Proteins stark beeinflussen, sind möglicherweise auch im Kontext des chimären HIV-IAP-Gag-Proteins für den Plasmamembrantransport wichtige Regionen nicht ausreichend exponiert. Ein Hinweis darauf wäre, daß mit zunehmender Länge des HIV-MA-Anteils und Deletion der Mia2-MA-Domäne die Affinität zu zellulären Membranen zuzunehmen scheint. Eine nukleäre Lokalisation der Gag-Polyproteine, wie sie bei HM-2n zu beobachten ist, findet sich bei HM-4n schon seltener und tritt bei HM-5n nicht mehr auf. Bei dem Konstrukt HM-6n ist möglicherweise durch die Klonierung ein Kerntransportsignal generiert worden, da die Proteine eine hohe Affinität zur Kernmembran und zur Plasmamembran (vergleichbar mit Mia4) zeigen. Das Membrantransportsignal des Src-Proteins besitzt eine deutlich höhere Affinität zur Plasmamembran als der N-terminale Bereich des HIV-MA-Proteins im Kontext der chimären HIV-IAP-Gag-Proteine. Das zeigt die im Zellüberstand des Kontrollkonstrukts Mia4 deutlich höhere Konzentration an viralen Proteinen. Zwischen den einzelnen HIV-IAP-Chimären gab es keine Unterschiede in der Partikelfreisetzung, so daß die für den spezifischen Plasmamembrantransport verantwortliche Region in HIV-MA nicht weiter eingegrenzt werden konnte.

### 3.2. Kontrollierter Transport intrazellulärer Proteine durch Dimerisierung

#### 3.2.1. Wirkungsweise des „Dimerizers“ AP1510

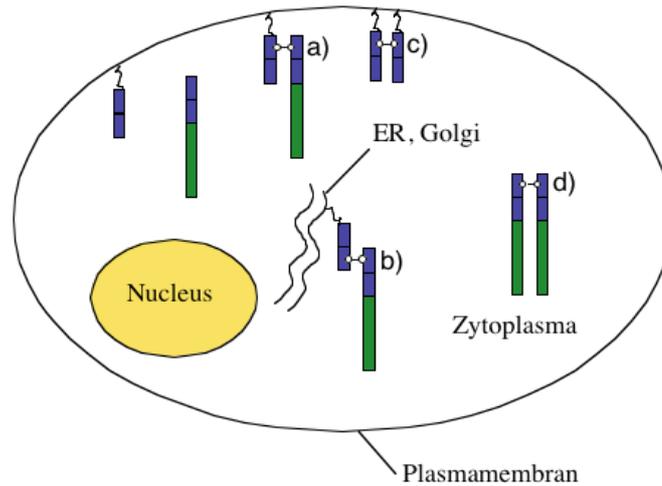
Die Analyse intrazellulärer Prozesse während der viralen Morphogenese wird erschwert durch deren asynchronen Ablauf. Es sollte daher eine Methode eingeführt werden, durch die der Membrantransport im Zytoplasma synthetisierter viraler Gag-Polypeptide von deren Transport an die Plasmamembran abgekoppelt werden kann. Erst nach Zugabe eines „Dimerizers“ sollte es durch Induktion intrazellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen zu einem Transport der entsprechenden Proteine an zelluläre Membranen kommen (s. Einleitung). Zu diesem Zweck wurde von der Firma ARIAD der synthetische „Dimerizer“ AP1510 zur Verfügung gestellt. Dieser kann eine Homodimerisierung zwischen zwei Fusionsproteinen herbeiführen, die jeweils eine oder mehrere FKBP-Bindungsdomänen enthalten (Abb. 14, rechts). Dazu werden zwei Plasmide co-transfiziert, wobei ein Plasmid für ein Fusionsprotein aus zwei FKBP-Bindungsdomänen mit einer vorgeschalteten Membrantransportdomäne des Src-Proteins (pCMF2E) kodiert und das zweite Plasmid die Expression eines beliebigen mit FKBP-Bindungsdomänen fusionierten Proteins (FKBP-xy, Abb.14, links) gewährleistet. Nach Expression sollte die Zugabe des „Dimerizers“ einen Membrantransport der im Zytosol lokalisierten Fusionsproteine induzieren (Abb. 15).

Der Ablauf der Dimerisierung wurde zunächst mit Hilfe des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) analysiert. Dazu wurde die Kinetik der Änderung der subzellulären Lokalisation der FKBP-Fusionsproteine untersucht und die benötigte Konzentration an „Dimerizer“ ausgetestet. Anschließend sollte dieses System für einen konditionalen Transport retroviraler Strukturproteine an die Plasmamembran erprobt werden.



**Abb. 14) Schematische Darstellung des Prinzips der Dimerisierung und des Src-FKBP(2)-Konstrukts (aus pCMF2E) mit möglichen FKBP-Fusionsproteinen**

Die Abbildung zeigt links „Dimerizer“-induzierte Interaktionen von Fusionsproteinen. Rechts erkennt man die schematische Darstellung des Konstrukts Src-FKBP(2) mit einem Myristylierungssignal im N-terminalen Bereich und mögliche Konstrukte für FKBP-xy-Fusionsproteine (xy = GFP, HIV-Gag, IAP-Gag) mit entweder einer oder zwei FKBP-Fusionsdomänen.

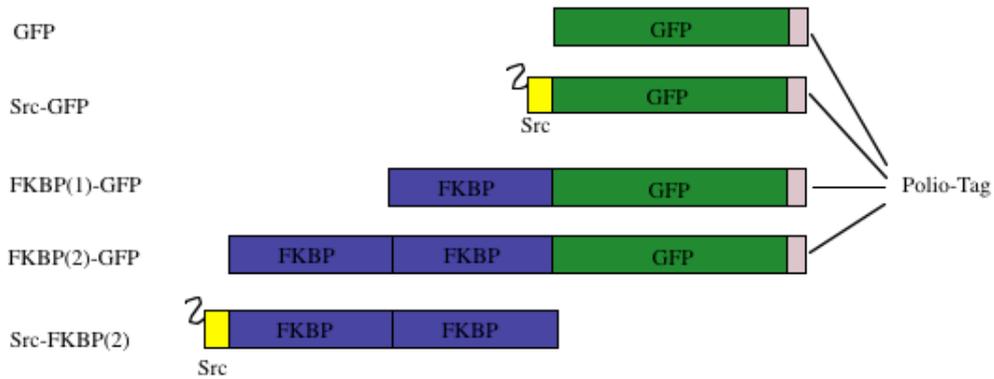


**Abb. 15) Schematische Darstellung der Interaktion von FKBP-Fusionsproteinen in der Zelle**

Nach gleichzeitiger Expression der FKBP-Fusionsproteine und des Src-FKBP(2)-Fusionsproteins wird das Src-FKBP(2)-Fusionsprotein an zelluläre Membranen transportiert. Eine Zugabe des „Dimerizers“ induziert Protein-Protein-Interaktionen zwischen FKBP-Fusionsproteinen und membranständigen Src-FKBP(2)-Proteinen an a) der Plasmamembran b) intrazellulären Membranen c) zwischen membranständigen Src-FKBP(2)-Fusionsproteinen d) zwischen den einzelnen FKBP-Fusionsproteinen innerhalb des Zytoplasmas.

**3.2.2. Biochemische Analyse und subzelluläre Lokalisation der FKBP-GFP-Fusionsproteine und des Src-FKBP(2)-Fusionsproteins**

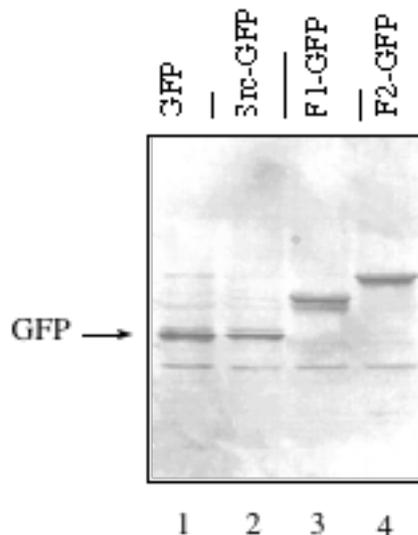
Es wurden Plasmide hergestellt, die für eine bzw. zwei FKBP-Domänen gefolgt von dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) aus *Aquaforea victoria* (Heim und Tsien, 1996) kodierte (Abb. 16). Als Kontrolle für diese Konstrukte diente ein Plasmid, das ein GFP-Gen trug. Ein weiteres Plasmid kodierte für ein GFP-Fusionsprotein mit einer N-terminal gelegenen Membrantransportdomäne des Src-Proteins und diente der Kontrolle der subzellulären Lokalisation membranständiger Proteine. Bereits erwähnt wurde das von der Firma ARIAD zur Verfügung gestellte Plasmid pCMF2E, das für zwei FKBP-Bindungsdomänen mit einer Membrantransportdomäne des Src-Proteins im N-terminalen Bereich kodierte (Src-FKBP(2)).



**Abb. 16) Schematische Darstellung der Genprodukte, die aus der Expression der folgenden Konstrukte resultieren: GFP und Src-GFP, der FKBP-GFP-Konstrukte und des Src-FKBP(2)-Konstrukts**

Schematische Übersicht über die Produkte der Expression von GFP und von GFP mit N-terminaler Membrantransportdomäne des Src-Proteins. Weiterhin sind GFP-Fusionsproteine mit jeweils einer bzw. zwei FKBP-Domänen (FKBP(1)-GFP, FKBP(2)-GFP) dargestellt sowie das Src-FKBP(2)-Fusionsprotein mit einem Myristilierungssignal im N-terminalen Bereich der beiden FKBP-Bindungsdomänen. Im C-terminalen Bereich aller GFP-Konstrukte befindet sich ein Epitop-Tag (Polio).

Es wurden die Plasmide pHHR-FKBP(1)-GFP und pHHR-FKBP(2)-GFP in Hela Zellen transient transfiziert. Die Expression und Stabilität der beiden Fusionsproteine konnte nach elektrophoretischer Auftrennung der Zellextrakte mittels Immunoblot im SDS-Polyacrylamidgel gezeigt werden (Abb. 17). Mit einem Antiserum gegen ein sich am C-terminalen Ende von GFP anschließendes Epitop-Tag (PO) konnte die unterschiedliche Größe der Proteine anhand ihres unterschiedlichen Laufverhaltens im SDS-Polyacrylamidgel dargestellt werden. Als Kontrolle dienten das GFP- und Src-GFP-Protein.

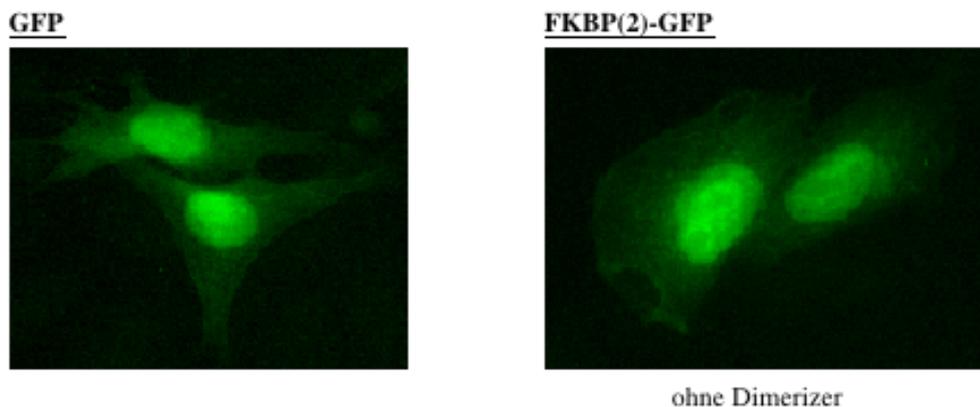


**Abb. 17) Western Blot Analyse der verschiedenen FKBP-GFP-Fusionsproteine.**

Nach transienter Transfektion von Hela Zellen mit pHHR-FKBP(1)-GFP und pHHR-FKBP(2)-GFP erfolgte die Analyse der Zellextrakte im Western Blot. Die Antigene wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen das am C-terminalen Ende des GFP-Proteins befindliche Polio-Tag detektiert. In Spur 1 und 2 sind die Kontrollproteine GFP und Src-GFP dargestellt. Spur 3 und 4 zeigt die FKBP(1)-GFP- und FKBP(2)-GFP-Fusionsproteine.

Zum Nachweis der subzellulären Lokalisation der FKBP(1)-GFP- und FKBP(2)-GFP-Fusionsproteine wurden die entsprechenden Plasmide in Hela Zellen transfiziert. Die Analyse wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

Obwohl das GFP-Protein kein Kerntransportsignal trägt, findet es sich weitgehend im Zellkern sowie diffus im Zytoplasma verteilt (Abb. 18). Eine ähnliche Verteilung wurde auch für die Fusionsproteine FKBP(1)-GFP und FKBP(2)-GFP beobachtet. Abb.18 zeigt die überwiegend nukleäre Betonung sowie eine diffuse, zytoplasmatische Verteilung der Fusionsproteine. Diese war homogen und die Proteine waren scheinbar nicht an zelluläre Strukturen gebunden.

**Subzelluläre Lokalisation des GFP-Proteins und FKBP(2)-GFP-Fusionsproteins****Abb. 18) Subzelluläre Lokalisation des GFP-Proteins und des FKBP(2)-GFP-Fusionsproteins**

24 h nach transienter Transfektion von Hela Zellen mit pHHR-GFP und pHHR-FKBP(2)-GFP wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und die Expression und subzelluläre Lokalisation der Proteine mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines FITC-Filteransatzes analysiert.

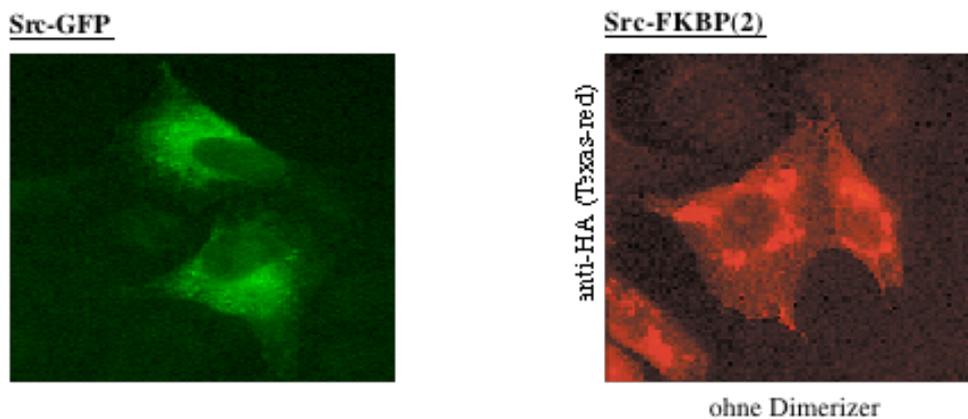
**3.2.3. Analyse der Lokalisationsänderungen der FKBP-GFP-Fusionsproteine nach Co-transfektion mit pCMF2E und anschließender Inkubation mit AP1510**

Abb. 19 zeigt die subzelluläre Lokalisation des Src-GFP-Proteins und des Src-FKBP(2)-Fusionsproteins nach transienter Transfektion der entsprechenden Plasmide in Hela Zellen.

Ergebnisse

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das HA-Tag am C-terminalen Ende des Src-FKBP(2)-Fusionsproteins wurde dieses Protein mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Src-GFP lokalisiert vorrangig perinukleär. Ein ähnliches Verteilungsmuster wurde für das Src-FKBP(2)-Fusionsprotein beobachtet. Darüber hinaus zeigte sich nach Expression dieses Proteins auch eine deutlich nachweisbare Fluoreszenz an der Plasmamembran. Dieses Verteilungsmuster änderte sich nicht nach Inkubation mit AP1510 (Daten nicht gezeigt).

### Subzelluläre Lokalisation der Src-GFP- und Src-FKBP(2)-Fusionsproteine



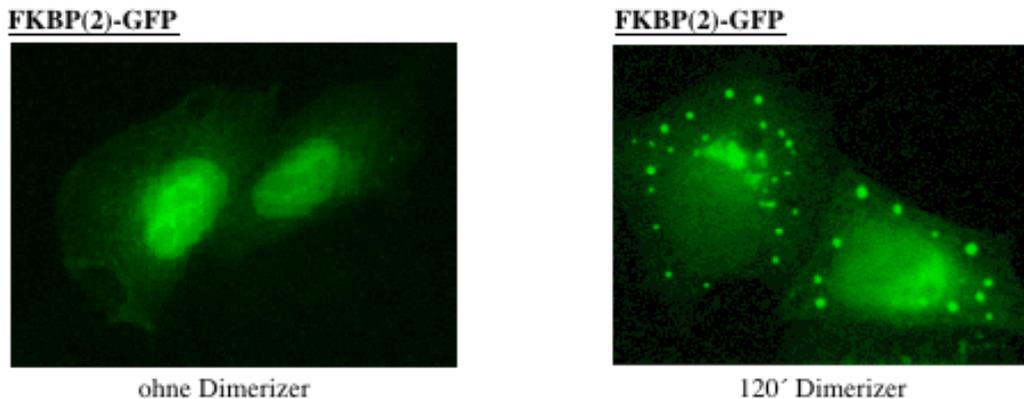
#### **Abb. 19) Subzelluläre Lokalisation des Src-GFP- und des Src-FKBP(2)-Fusionsproteins**

Dargestellt ist die subzelluläre Lokalisation der Src-GFP- und der Src-FKBP(2)-Fusionsproteine 24 h nach transienter Transfektion von pHHR-Src-GFP und des für Src-FKBP(2) kodierenden Plasmids in HeLa Zellen. Detektiert wurde das Src-FKBP(2)-Fusionsprotein mit einem monoklonalen Antiserum gegen das HA-Tag im C-terminalen Bereich der FKBP-Domäne.

Um den kinetischen Ablauf der Lokalisationsänderung der Fusionsproteine nach Zugabe des „Dimerizers“ untersuchen zu können, wurden zunächst die Plasmide pHHR-FKBP(1)-GFP und pHHR-FKBP(2)-GFP einfach in HeLa Zellen transfiziert (Abb. 20). Nach Bestimmung der optimalen GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen mit der niedrigsten von der Firma ARIAD empfohlenen „Dimerizer“-Konzentration (1,0 ng/ml) inkubiert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von AP1510 auf eine Änderung der subzellulären Lokalisation der Proteine hin untersucht.

In der Immunfluoreszenz zeigten sich granuläre Strukturen, welche über das gesamte Zytoplasma verteilt waren, ohne erkennbare Relation zu bestimmten zellulären Strukturen. Dieser Phänotyp konnte allerdings nur für die FKBP(2)-GFP-Fusionsproteine beobachtet werden. FKBP(1)-GFP-Fusionsproteine zeigten nach Inkubation mit dem „Dimerizer“ keine Lokalisationsänderung (Daten nicht gezeigt).

### Subzelluläre Lokalisation von FKBP(2)-GFP vor und nach Inkubation mit AP1510



**Abb. 20) Subzelluläre Lokalisation der FKBP(2)-GFP-Fusionsproteine nach Inkubation mit AP1510 (einfache Transfektion)**

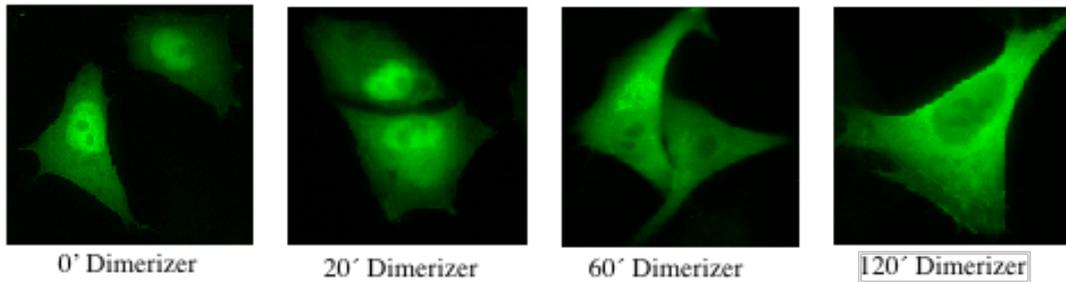
Es wurde das Plasmid pHHR-FKBP(2)-GFP transient in HeLa Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und die Proteine auf ihre subzelluläre Lokalisation hin analysiert. Dargestellt ist die subzelluläre Lokalisation des FKBP(2)-GFP-Fusionsproteins vor Inkubation mit AP1510 und nach zweistündiger Inkubation mit AP1510.

Anschließend wurden HeLa Zellen mit dem bereits beschriebenen pCMF2E und jeweils einem der beiden Plasmide pHHR-FKBP(1)-GFP bzw. pHHR-FKBP(2)-GFP co-transfiziert (Abb. 21). Die Zellen wurden wiederum mit der niedrigsten von der Firma ARIAD empfohlenen „Dimerizer“-Konzentration (1,0 ng/ml) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von AP1510 auf eine Änderung der subzellulären Lokalisation der Proteine hin untersucht.

Zum Zeitpunkt der Zugabe des „Dimerizers“ ließ sich eine homogene Fluoreszenzanreicherung mit Betonung des Zellkerns beobachten. Dieser Phänotyp entsprach dem intrazellulären Verteilungsmuster der GFP-FKBP(1)- und GFP-FKBP(2)-Fusionsproteine. 20 min nach Zugabe von AP1510 sah man bereits bei einem Teil der transfizierten Zellen eine zytoplasmatische Fluoreszenzanreicherung mit perinukleär lokalisiertem Hauptsignal. Die Übergänge zwischen überwiegend nukleärer Fluoreszenzanreicherung hin zu kompletter Aussparung des Zellkerns waren fließend (Abb. 21, oben). Mit zunehmender AP1510-Inkubationsdauer nahm jedoch die Zahl der transfizierten Zellen mit stark perinukleärer Fluoreszenzanreicherung und Aussparung des Zellkerns zu. Nach 60 min war bereits bei ca. 75%, nach 120 min bei ca. 95% der transfizierten Zellen eine Lokalisationsänderung der Fusionsproteine zu erkennen. Für die FKBP(1)-GFP-Fusionsproteine wurde nach Inkubation mit AP1510 keine

Lokalisationsänderung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Kontrolle, welche mit dem Konstrukt pHHR-Src-GFP durchgeführt wurde, zeigte nach Expression der Src-GFP-Proteine den gleichen perinukleär lokalisierenden Phänotyp wie das GFP-FKBP(2)-Fusionsprotein nach Co-Transfektion mit Src-FKBP(2) und Inkubation mit dem „Dimerizer“ (Abb. 21, unten).

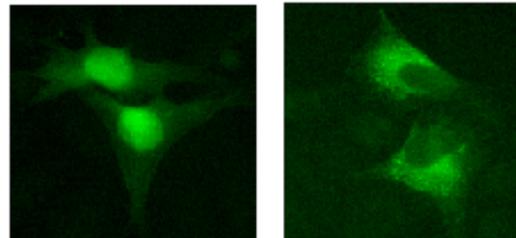
**Co-Transfektion des FKBP(2)-GFP mit Src-FKBP(2)**



**Kontrollen**

**GFP**

**src-GFP**



**Abb. 21) Subzelluläre Lokalisation der FKBP(2)-GFP-Fusionsproteine nach Co-Transfektion mit pCMF2E und vor/nach Inkubation mit dem „Dimerizer“ AP1510 (oben)**

Die Co-Transfektion der HeLa-Zellen (oben) wurde mit den beiden Konstrukten pHHR-FKBP(2)-GFP und pCMF2E durchgeführt. Die Zellen wurden nach unterschiedlich langer Inkubation mit dem „Dimerizer“ AP1510 (0', 20', 60', 120') mit Formaldehyd fixiert und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops auf die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine hin analysiert.

Kontrollen (unten): Dargestellt sind die subzelluläre Lokalisation des GFP-Proteins und des Src-GFP-Fusionsproteins nach transienter Transfektion der entsprechenden Plasmide in HeLa Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und die Lokalisation der Fusionsproteine im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die durch AP1510 induzierte Umverteilung der FKBP-GFP-Fusionsproteine verlief nicht synchron in allen Zellen innerhalb eines Experiments. Dies war sowohl in der Co-Transfektion mit pCMF2E als auch in der einfachen Transfektion des pHHR-FKBP(2)-GFP-Plasmids nach Inkubation mit dem „Dimerizer“ zu beobachten. Es fanden sich gleichzeitig Zellen mit stark nukleärer Konzentration der FKBP(2)-GFP-Fusionsproteine und Zellen mit perinukleärer Lokalisation der Fusionsproteine und zunehmender Fluoreszenzaussparung des Zellkerns. Lediglich die Anzahl der Zellen, in denen es zu einer Lokalisationsänderung

gekommen war, variierte. Wie bereits beschrieben, war dies nach 30 min bei der Hälfte und nach einer Stunde bei 95% der transfizierten Zellen der Fall (Daten nicht gezeigt).

Durch Eigenfluoreszenz des GFP-Proteins und indirekte Immunfluoreszenz mit einem Texas Red-Antikörper gegen den C-terminal gelegenen HA-Tag des Src-FKBP(2)-Proteins wurde die Co-Lokalisation dieser beiden Proteine deutlich (Daten nicht gezeigt).

### **3.2.4. Bedingungen für die Anwendung des „Dimerizers“ AP1510**

Die Experimente zeigen, daß ein Transport intrazellulärer Proteine mit Hilfe der Dimerisierung möglich ist. Die in dem experimentellen System verwendete minimale Konzentration des „Dimerizers“ AP1510 (1,0 ng/ml) bewirkt eine Umverteilung der FKBP-Fusionsproteine. Dies konnte allerdings nur für die Fusionsproteine mit zwei FKBP-Bindungsdomänen beobachtet werden. Jeweils zwei FKBP-Bindungsdomänen erhöhen anscheinend die Wahrscheinlichkeit einer Induktion von Protein-Protein-Interaktionen durch den „Dimerizer“ AP1510 um ein vielfaches.

Nach Expression des Src-FKBP(2)-Proteins ist dieses ausschließlich an zellulären Membranen nachweisbar. Das FKBP(2)-GFP-Fusionsprotein, das vor Inkubation mit AP1510 eine nukleäre Fluoreszenz zeigt, wird nicht aktiv aus dem Zellkern transportiert, sondern diffundiert vermutlich zwischen Zellkern und Zytoplasma. Im Falle der Bindung an Src-FKBP(2) wird es aus diesem Gleichgewicht entfernt und an den zellulären Membranen festgehalten. Im Falle der einfachen Transfektion wird es durch Akkumulation der FKBP(2)-GFP-Fusionsproteine im Zytoplasma festgehalten.

### **3.3. Dimerisierung – Konditionales „Targeting“ retroviraler Strukturproteine**

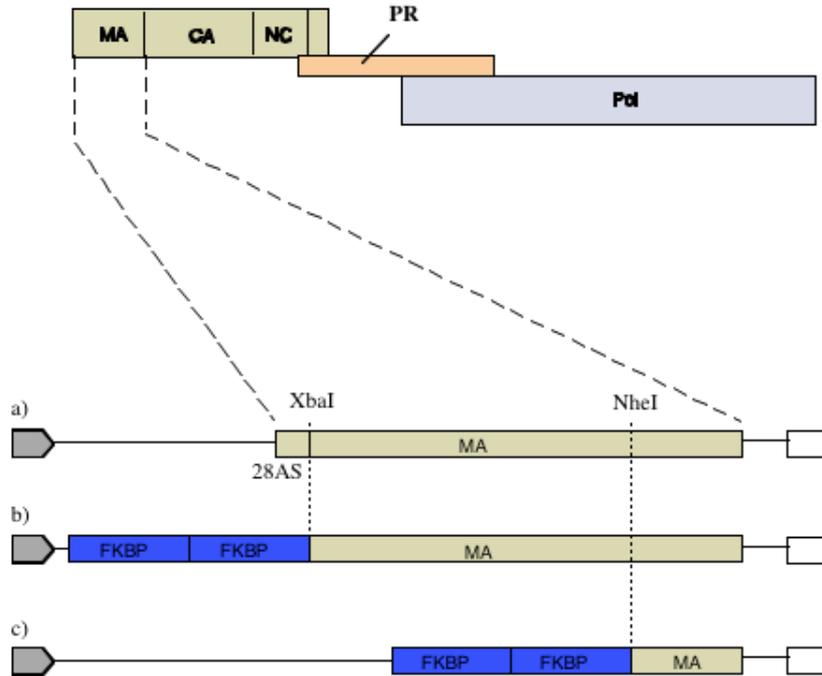
#### **3.3.1. Bedeutung der Dimerisierungsmethode für die Analyse der viralen Morphogenese**

Um die Bedeutung der Dimerisierungsmethode als intrazellulären Transportmechanismus für virale Gag-Proteine beurteilen zu können, wurden zwei unterschiedliche Retroviren ausgewählt. Für das endogene Retrovirus IAP stand der Transport der viralen Strukturproteine an die Plasmamembran und damit die Freisetzung reifer Viruspartikel im Vordergrund. Für HIV sollte anhand der Daten aus der Untersuchung zur Dimerisierungskinetik von FKBP-GFP-Fusionsproteinen die Synchronisierung von „Assembly“ und „Budding“ nach Zugabe von AP1510 ermöglicht werden. Damit sollten Aussagen über den Ablauf der Virusfreisetzung und der Aktivierung der viralen Protease gemacht werden können.

#### **3.3.2. Klonierungsstrategie und Analyse der Expression der FKBP-IAP-Gag-Proteine**

Die zu den endogenen Retroviren gehörenden murinen Intrazisternalen A-Typ Partikel (IAP) durchlaufen in ihrem Replikationszyklus keine extrazelluläre Phase. Statt dessen sieht man in elektronenmikroskopischen Aufnahmen „Budding“-Strukturen am ER und Akkumulationen unreifer Viruspartikel in intrazellulären Zisternen. Es sollte daher untersucht werden, ob durch Dimerisierung ein wirksamer Transport von FKBP-IAP-Gag-Fusionsproteinen an die Plasmamembran induziert werden kann. Der Austausch der viralen Membrantransportdomäne mit der Transportdomäne des Src-Proteins bzw. der N-terminalen HIV-MA-Domäne hatte bereits Plasmamembrantransport induzieren können, der in Partikelfreisetzung und Aktivierung der viralen Protease resultierte (Welker et al., 1997; siehe Ergebnisse, 3.1.). Es sollte nun geprüft werden, ob auch die Dimerisierung diese Funktion übernehmen und einen kontrollierten Transport der FKBP-IAP-Gag-Fusionsproteine induzieren kann.

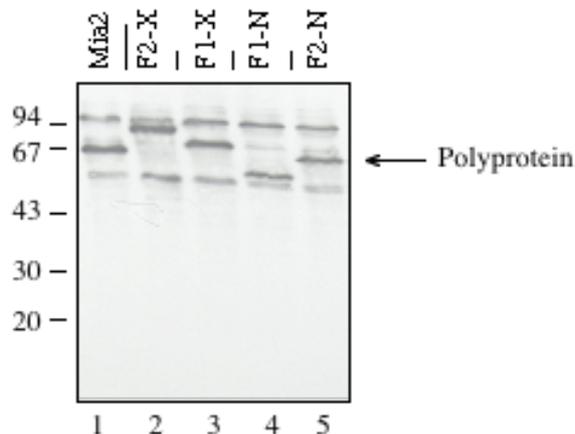
Ein Austausch der ersten 28 Kodons des 5'-Endes der für IAP-MA kodierenden Sequenz durch eine bzw. zwei für FKBP-Bindungsdomänen kodierende Sequenzen bildete die ersten Konstrukte (pHHR-FKBP(1)-Mia2X, pHHR-FKBP(2)-Mia2X). Für weitere Klonierungen wurden 2/3 der IAP-MA-Region über eine *NheI* Schnittstelle deletiert und ebenfalls durch je eine bzw. zwei FKBP-Domänen ersetzt (pHHR-FKBP(1)-Mia2N, pHHR-FKBP(2)-Mia2N) (Abb. 22).



**Abb. 22) Schematische Darstellung der pHHR-FKBP(2)-Mia2N/X-Konstrukte**

**a)** Schematische Darstellung der für das Mia2-MA-Protein kodierenden Sequenz mit den 28 N-terminalen 28 stark hydrophoben Aminosäuren. **b)** über die *Xba*I Schnittstelle an Position 677 in den pHHR-Mia2 Vektor kloniertes FKBP-Fragment **c)** über die Schnittstelle *Nhe*I (2/3 Deletion von MA) in den pHHR-Mia2-Vektor kloniertes FKBP-Fragment

Die beschriebenen Plasmide wurden transient in Hela Zellen transfiziert. Die viralen Proteine wurden nach Zellyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen IAP im Western Blot detektiert. Die unterschiedliche Größe der Gag-Polypoteine entsprach den Erwartungen für die verschiedenen Fusionsproteine. Damit wurde weiterhin gezeigt, daß die Fusionsproteine stabil waren und die FKBP-Anteile nicht degradiert wurden (Abb. 23).



**Abb. 23) Western Blot Analyse der verschiedenen FKBP-IAP-Fusionsproteine**

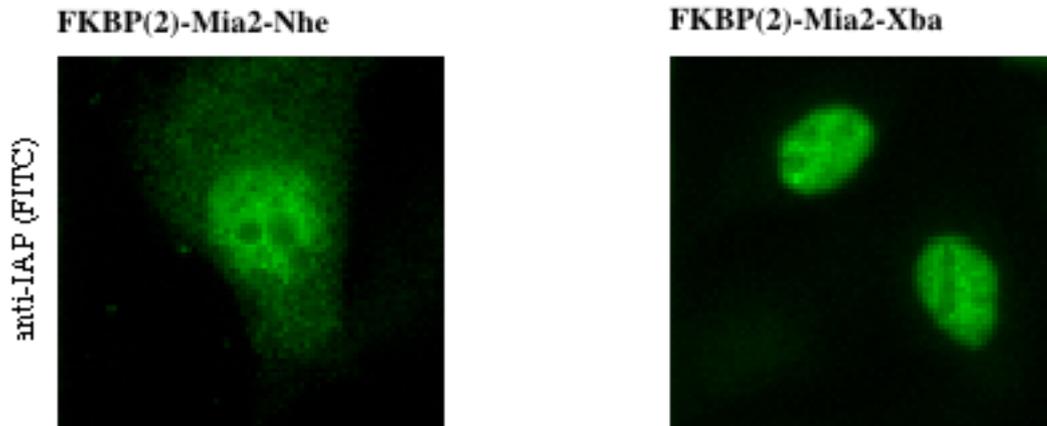
48 h nach transienter Transfektion von Hela P4-CCR5 Zellen mit dem pHHR-Mia2 Plasmid und den Konstrukten pHHR-FKBP(1)-Mia2X/N und pHHR-FKBP(2)-Mia2X/N wurden die Zellextrakte mit SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion der viralen Proteine erfolgte mit einem polyklonalen Antiserum gegen IAP. In Spur 1 befindet sich die Wildtyp-Kontrolle. Spur 2 und 3 enthalten die FKBP(2)-Mia2X- und FKBP(1)-Mia2X-Fusionsproteine. In Spur 4 und 5 sind die FKBP(1)-Mia2N- und FKBP(2)-Mia2N-Fusionsproteine dargestellt.

Die indirekte Immunfluoreszenz sollte nach transienter Transfektion der Plasmide in Hela Zellen Aufschluß über die Expressionseffizienz und die Lokalisation der Fusionsproteine geben. Außerdem sollte überprüft werden, ob im Falle der Co-Transfektion mit pCMF2E die Zugabe des „Dimerizers“ eine Lokalisationsänderung der Fusionsproteine bewirkt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit einem polyklonalen Antiserum gegen IAP.

Nach einfacher Transfektion von pHHR-FKBP(1)-Mia2X und pHHR-FKBP(2)-Mia2X fanden sich die entsprechenden Fusionsproteine ausschließlich im Zellkern (Abb. 24). Im Gegensatz dazu zeigte sich für die FKBP(1)-Mia2N- und FKBP(2)-Mia2N-Fusionsproteine ein sehr heterogenes Verteilungsmuster. In einigen Zellen war eine nukleäre Fluoreszenzanreicherung und in anderen Zellen eine zytoplasmatische Verteilung, teilweise granulär, teilweise diffus, zu beobachten (Abb. 24). Der Phänotyp der pHHR-FKBP(1)-Mia2X- und pHHR-FKBP(2)-Mia2X-transfizierten Zellen zeigte keine Unterschiede. Auch das Verteilungsmuster der FKBP(1)-Mia2N- und FKBP(2)-Mia2N-Fusionsproteine war gleich.

Die Expressionseffizienz der chimären FKBP-IAP-Gag-Fusionsproteine war relativ gering. Weitere Probleme ergaben sich bei der Co-Transfektion der Plasmide mit pCMF2E. Die gleichzeitige Expression von Src-FKBP(2) und den FKBP-Mia2X/N-Fusionsproteinen war offensichtlich nicht möglich, da sich auch bei dem Versuch die Konzentrationen der transfizierten DNA auszutitrieren keine viralen Proteine nachweisen ließen. Daraufhin wurden keine weiteren Versuche mit diesem Modell durchgeführt.

**pHHR-FKBP(2)-Mia2N und pHHR-FKBP(2)-Mia2X – einfache Transfektion**



**Abb. 24) Immunfluoreszenzanalyse der Fusionsproteine FKBP(2)-Mia2N und FKBP(2)-Mia2X**  
48 Stunden nach transienter Transfektion von HeLa Zellen mit pHHR-FKBP(2)-Mia2N und pHHR-FKBP(2)-Mia2X wurden die Zellen mit Methanol-Aceton fixiert und die subzelluläre Lokalisation der FKBP(2)-IAP-Fusionsproteine mit einem polyklonalen Antiserum gegen IAP nachgewiesen.

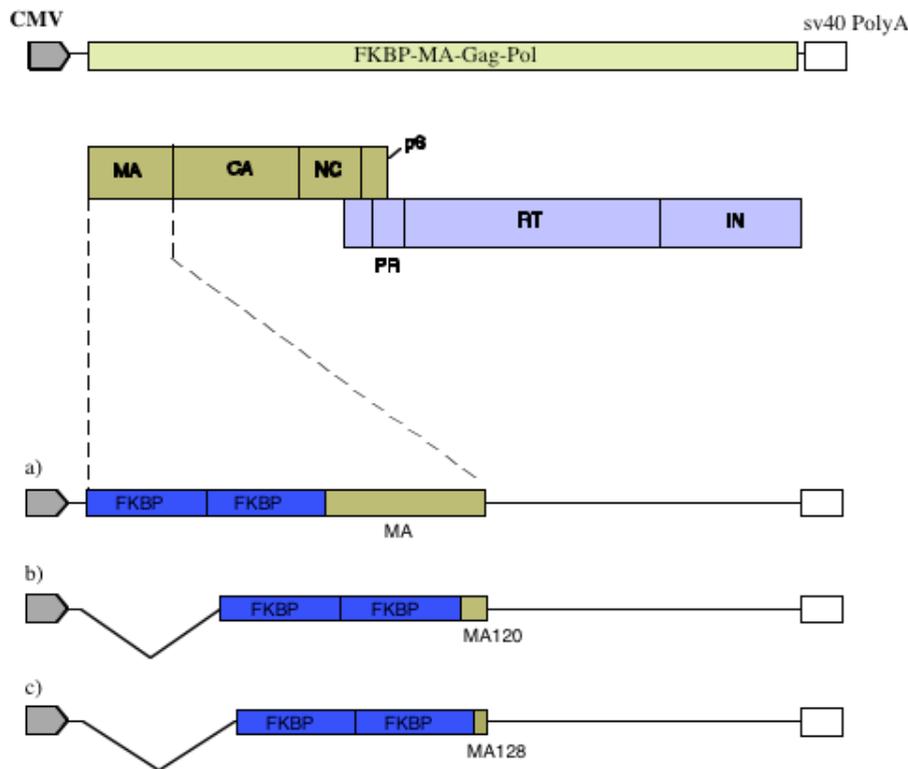
**3.3.3. Klonierungsstrategie für die Expression der FKBP-Gag- bzw. FKBP-Gag-Pol Fusionsproteine von HIV**

Das MA-Region, die sich im N-terminalen Bereich von HIV-Gag befindet, spielt eine wesentliche Rolle im spezifischen Membrantransport und bei der Verankerung der viralen Strukturproteine in der Plasmamembran. Diese Funktion ist auf die co-translationale Myristilierung und eine Anzahl basischer Aminosäuren im N-terminalen Bereich von HIV-MA zurückzuführen. Die nachfolgenden Experimente sollten zeigen, ob durch die Dimerisierung ein kontrollierter Transport der viralen Strukturproteine an die Plasmamembran induziert werden kann.

Dazu wurde das N-terminal gelegene Myristilierungssignal von HIV-MA durch ein bzw. zwei FKBP-Bindungsdomänen ersetzt (Abb. 25a). Ein weiterer Ansatz war der Austausch des gesamten HIV-MA durch ein bzw. zwei FKBP-Domänen. Die Deletion in der HIV-MA-kodierenden Sequenz erfolgte dabei so, daß die Spaltstelle zwischen MA und CA für die Prozessierung durch die virale Protease noch zur Verfügung stand. Das zweite Konstrukt enthielt daher die letzten 12 Kodons von HIV-MA (MA120) mit jeweils einer bzw. zwei FKBP-Domänen im N-terminalen Bereich (Abb. 25b). Das letzte Konstrukt setzte sich aus den vier C-terminalen Kodons von HIV-MA (MA128) und ein bzw. zwei FKBP-Domänen

zusammen (Abb. 25c). Die vier C-terminalen AS des MA-Proteins umfassen die für die Prozessierung durch die virale Protease minimal benötigte Sequenz.

Die beschriebenen FKBP-Gag-Fusionsproteine wurden zuerst im Kontext eines in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen *gag-pol*-Vektors exprimiert (H.Wodrich, Dissertation).



**Abb. 25) Schematische Darstellung der für die FKBP(2)-Gag-Fusionsproteine kodierenden Konstrukte im Kontext des HHR-gag-pol-Vektors (FKBP(1)-Konstrukte sind für alle weiteren Experimente nicht relevant und daher nicht mit abgebildet, siehe Ergebnisse 3.2.)**

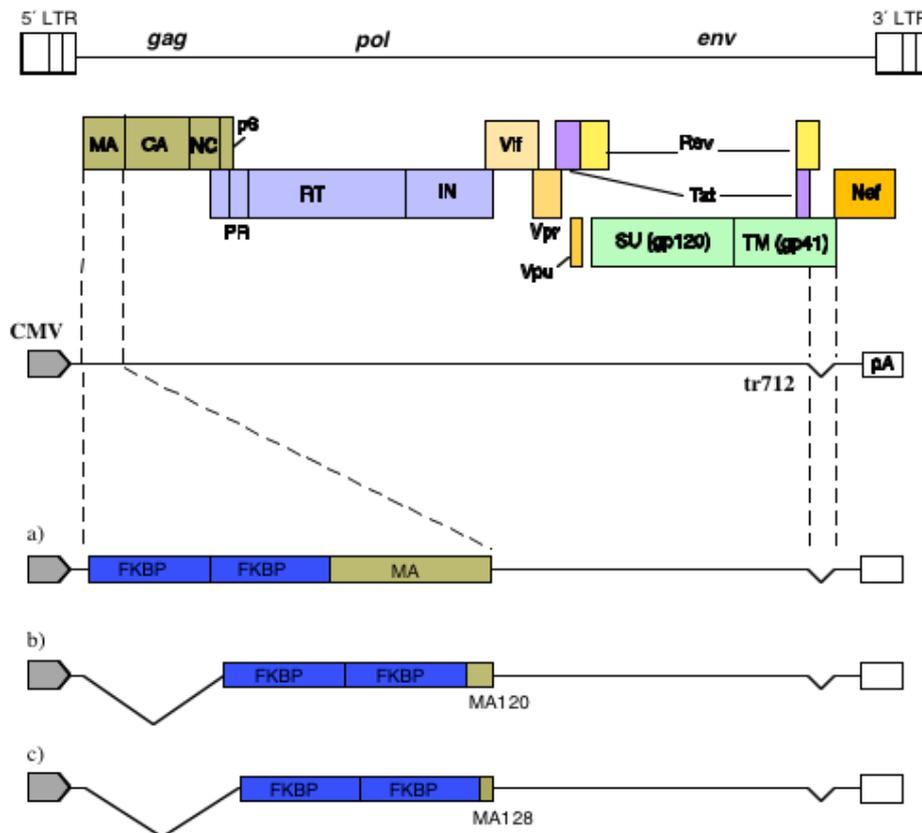
a) Schematische Darstellung des Plasmids pHHR-FKBP(2)-gag-pol mit zwei FKBP-Domänen im N-terminalen Bereich von HIV-MA b) nach Deletion der ersten 120 AS der HIV-MA-Sequenz und Ersatz durch zwei FKBP-Domänen c) nach Austausch der ersten 128 AS der HIV-MA-Sequenz durch zwei FKBP-Domänen.

Nach transienter Transfektion der beschriebenen Expressionsvektoren in Hela Zellen zeigte sich in der Immunfluoreszenz eine vorrangig zytoplasmatische Verteilung der FKBP(2)-Gag- und FKBP(2)-Gag-Pol-Fusionsproteine. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz und der Immunoblot-Analyse waren allerdings aufgrund einer sehr schwachen Expression als Grundlage für weitere Experimente nicht verwendbar (Daten nicht gezeigt).

Für alle weiteren Versuche wurde daher ein Vektor verwendet, der die gesamte kodierende Region aus dem HIV-Klon pNL4-3, sowie einen Teil der 5'-untranslatierten Region ab Nukleotid 711, einschließlich des „major splice donors“ (MSD) enthielt (Abb. 26). Durch

Deletion der 5'- und 3'-LTRs waren essentielle Replikationssignale entfernt worden, so daß die entstandenen Konstrukte nicht mehr zur Bildung infektiöser HIV-Partikel befähigt waren. Die Expression erfolgte unter Kontrolle des CMV-Promotors. Eine Mutation in *env*, die Kodon 712 zu einem STOP-Kodon konvertierte, bewirkte eine Verkürzung des zyttoplasmatischen Anteils des transmembranen Glykoproteins. Ein so verändertes Glykoprotein kann auch in Partikel mit Veränderungen im MA-Protein eingebaut werden (Abb. 26; Wilk et al., 1992; Reil et al., 1998).

Da die Experimente mit FKBP(1)-GFP und FKBP(2)-GFP gezeigt hatten, daß zwei FKBP-Domänen für eine effiziente intrazelluläre Relokalisation während der Inkubation der Zellen mit AP1510 notwendig sind, wurden die FKBP(1)-enthaltenden Konstrukte bei allen weiteren Klonierungen nicht mehr berücksichtigt.

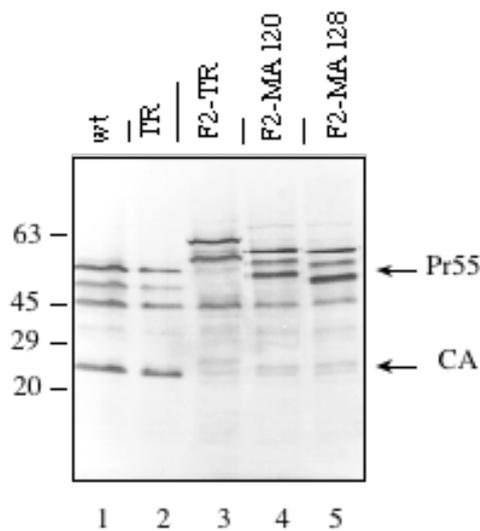


**Abb. 26) Schematische Darstellung der beschriebenen Konstrukte im Kontext des HHR-HIV-TR-Vektors**

Der Vektor enthält auf der Grundlage des HIV-1 proviralen Plasmides die gesamte kodierende Region des HIV-Genoms ab Nukleotid 711. Eine Mutation im Kodon 712 des *env* offenen Leserahmens bildet ein Stopkodon, so daß die nachfolgende Region (der zyttoplasmatische Anteil des Transmembranproteins) nicht translatiert wird. Die drei verschiedenen Klone unterscheiden sich im N-terminalen Bereich durch **a)** Klonierung der zwei FKBP-Domänen an das N-terminale Ende von HIV-MA **b)** Austausch der N-terminalen 120 AS von HIV-MA durch zwei FKBP-Domänen, **c)** Austausch der N-terminalen 128 AS von HIV-MA durch zwei FKBP-Domänen.

Zum Nachweis der Expression der verschiedenen Fusionsproteine wurden HeLa Zellen mit den Plasmiden pHHR-FKBP(2)-TR, pHHR-FKBP(2)-MA120-TR und pHHR-FKBP(2)-MA128-TR sowie den Kontrollplasmiden pHHR-HIV-wt und pHHR-HIV-TR transient transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellysate im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die viralen Strukturproteine mit einem polyklonalen Kaninchenantiserum gegen HIV-CA detektiert.

In allen Zellysaten konnten mittels Western Blot Analyse die viralen Gag-Polypeptide nachgewiesen werden (Abb. 27). Die Expressionsstärke war bei allen Konstrukten etwa gleich. Die unterschiedliche Größe der Gag-Proteine korrelierte mit dem Umfang der Deletionen innerhalb des HIV-MA-Proteins und der Größe der insertierten FKBP(2)-Domäne (FKBP(2)-MA120-TR – ca. 50 kDa, FKBP(2)-MA128-TR - ca. 49 kDa). Dabei war bei FKBP(2)-HIV-TR entsprechend der kleinen Deletion in MA ein deutlich größeres FKBP(2)-Gag-Fusionsprotein zu erkennen. Dies entspricht einem Molekulargewicht von ca. (61 kDa). In allen Fällen fanden sich neben dem Polyprotein weitere spezifische Proteine mit geringerem Molekulargewicht. Bei HIV-wt und HIV-TR entsprechen diese den Spaltprodukten der viralen Protease. Die Prozessierung findet vermutlich in geringerem Umfang auch bei den chimären Proteinen statt.



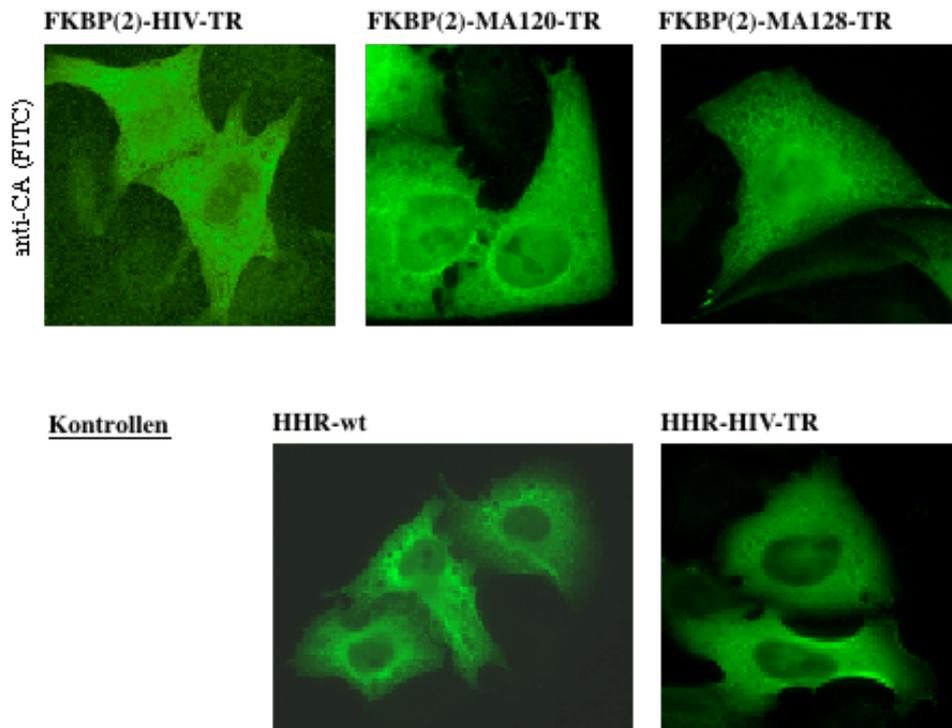
**Abb. 27) Western Blot Analyse der FKBP(2)-HIV-Fusionsproteine**

24 h nach transienter Transfektion von HeLa P4-CCR5 Zellen mit den oben genannten Plasmiden wurden die Zellextrakte mit SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Proteine wurden mit einem Antiserum gegen HIV-CA nachgewiesen. Die Spuren 1 und 2 zeigen jeweils die Kontrollen HIV-wt und HIV-TR. In den Spuren 3, 4, 5 sind die FKBP(2)-HIV-TR-, FKBP(2)-MA120-TR- und FKBP(2)-MA128-TR-Fusionsproteine dargestellt.

### 3.3.4. Lokalisation und „Dimerizer“-induzierte Lokalisationsänderung der FKBP-HIV-Gag-Fusionsproteine

Um die subzelluläre Lokalisation der viralen Gag-Polyproteine zu untersuchen, wurden HeLa Zellen mit pHHR-FKBP(2)-HIV-TR, pHHR-FKBP(2)-MA120-TR und pHHR-FKBP(2)-MA128-TR sowie den Kontrollen pHHR-HIV-wt und pHHR-HIV-TR transient transfiziert und mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums gegen HIV-CA analysiert (Abb. 28). Bei allen Konstrukten wurde eine relativ homogene zytoplasmatische Verteilung der viralen Gag-Proteine mit teilweiser Aussparung des Zellkerns sowie eine starke Syncytienbildung beobachtet. Phänotypisch waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den mit den Kontrolleplasmiden pHHR-HIV-wt und pHHR-HIV-TR (Abb. 28, unten) und den Plasmiden pHHR- FKBP(2)-HIV-TR, pHHR-FKBP(2)-MA120-TR und pHHR-FKBP(2)-MA128-TR (Abb. 28, oben) transfizierten Zellen zu erkennen. Die Transfektionseffizienz lag für alle Konstrukte bei ca. 60% (Daten nicht gezeigt).

#### FKBP(2)-HIV-Konstrukte und Kontrollplasmide - einfache Transfektion

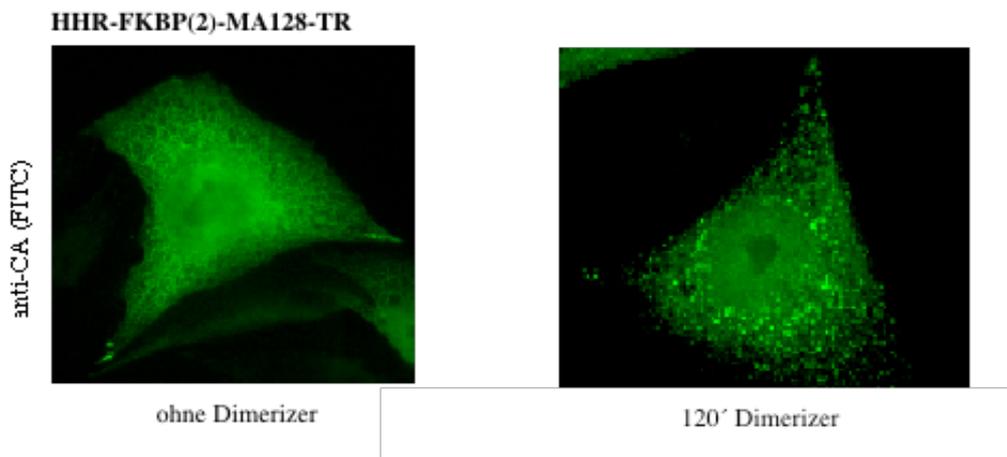


**Abb. 28) Subzelluläre Lokalisation der FKBP(2)-MA120-TR-, FKBP(2)-HIV-TR-, FKBP(2)-MA128-TR-Gag-Proteine und der HIV-wt- und HIV-TR-Gag-Proteine**

24 Stunden nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen mit den genannten Konstrukten wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Dargestellt sind die Fusionsproteine in der Immunfluoreszenz, detektiert mit einem Antiserum gegen HIV-CA und einem FITC-markierten sekundären Antikörper.

Um die Auswirkung der Dimerisierung auf die Lokalisationsänderung der verschiedenen FKBP(2)-HIV-Fusionsproteine zu überprüfen, wurden Hela Zellen mit den FKBP(2)-HIV-Konstrukten einfach transfiziert, und mittels eines präabsorbierten polyklonalen Antikörpers gegen HIV-CA die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine vor und nach Inkubation mit dem „Dimerizer“ analysiert (Abb. 29). Die homogene zytoplasmatische Fluoreszenzverteilung änderte sich nach 120 min Inkubation mit dem „Dimerizer“ bei allen Konstrukten zu einem stark granulär-vesikulären Muster mit einer Verteilung dieser Strukturen über den gesamten zytoplasmatischen Bereich.

### **pHHR-FKBP(2)-MA128-TR – einfache Transfektion ohne/mit „Dimerizer“**



**Abb. 29) Lokalisation von FKBP(2)-MA128-TR-Gag-Proteinen vor und nach Inkubation mit dem „Dimerizer“**

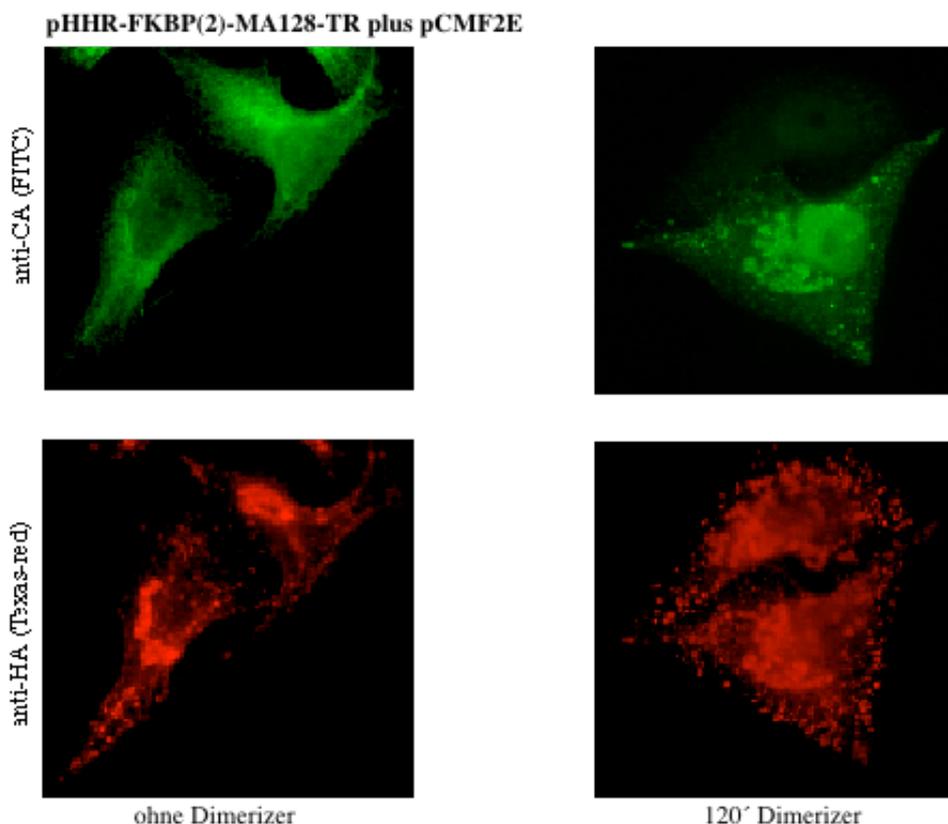
a) pHHR-FKBP(2)-MA128-TR wurde einfach in Hela Zellen transfiziert und die Proteinexpression und subzelluläre Lokalisation der viralen Gag-Proteine vor und nach Inkubation mit AP1510 (für 2 Stunden) mit einem Antiserum gegen HIV-CA analysiert.

Anschließend wurden pHHR-FKBP(2)-HIV-TR, pHHR-FKBP(2)-MA120-TR und pHHR-FKBP(2)-MA128-TR mit pCMF2E co-transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde die Proteinexpression und subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine vor und nach Inkubation mit dem „Dimerizer“ analysiert. Die indirekte Doppelimmunfluoreszenz wurde mit einem präabsorbierten polyklonalen Antikörper gegen HIV-CA und einem monoklonalen Antiserum gegen das HA-Tag des Src-FKBP(2)-Proteins durchgeführt.

Die Lokalisation der viralen Proteine entsprach wiederum dem in der einfachen Transfektion beobachteten Bild mit einer sehr homogenen zytoplasmatischen Fluoreszenzverteilung (Abb. 30, oben). Das Src-FKBP(2)-Protein zeigte in der Co-Transfektion die bereits beschriebenen perinukleären Akkumulationen und Fluoreszenzanreicherung an der Plasmamembran.

Analysen hinsichtlich der Lokalisationsänderung der viralen Polyproteine nach Zugabe des Dimerizers wurden analog zu den Experimenten mit FKBP(2)-GFP und Src-FKBP(2) nach 30, 60, 120 und 240 min durchgeführt. Nach Co-Transfektion der FKBP(2)-HIV-Konstrukte mit pCMF2E ergab die Inkubation mit dem „Dimerizer“ einen anderen Phänotyp als nach einfacher Transfektion der FKBP(2)-HIV-Konstrukte. Es war eine deutliche, perinukleäre Akkumulation der viralen Gag-Proteine zu erkennen, wobei es sich vermutlich um eine Co-Lokalisation beider Proteine handelte (Abb. 30, unten; Daten für FKBP(2)-HIV-TR und FKBP(2)-MA120-TR nicht gezeigt). Im Vergleich zur einfachen Transfektion der FKBP(2)-HIV-Konstrukte waren sehr wenig Syncytien gebildet worden. Nur in solchen Fällen, in denen sich ausschließlich virale Proteine in den Zellen nachweisen ließen, war eine Verschmelzung mit Plasmamembranen benachbarter Zellen zu erkennen. Der Anteil der doppelt transfizierten Zellen lag bei über 50%.

#### Co-Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR und pCMF2E ohne/mit „Dimerizer“



**Abb. 30) Lokalisation von FKBP(2)-MA128-TR und Src-FKBP(2) vor und nach Inkubation mit dem „Dimerizer“**

Doppelimmunfluoreszenz nach Co-Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR und pCMF2E mit einem FITC markierten sekundären Antikörper gegen das HIV-CA-Antiserum aus Kaninchen und einem Texas-Red markierten sekundären Antikörper gegen den monoklonalen Maus-Anti-HA-Antikörper. Die Analyse wurde vor und nach zweistündiger Inkubation der Zellen mit dem „Dimerizer“ AP1510 durchgeführt.

Die beschriebenen Veränderungen wurden für die drei FKBP(2)-HIV-Konstrukte beobachtet. Da die Transfektionseffizienz für alle Konstrukte gleich war, wurde für die nachfolgenden Experimente das Konstrukt mit der minimalen C-terminalen HIV-MA-Sequenz, pHHR-FKBP(2)-MA128-TR, verwendet. Diese Experimente zeigen deutlich, daß durch die Dimerisierung eine Lokalisationsänderung der viralen Gag-Proteine erreicht werden kann. Dabei werden offensichtlich verschiedene Protein-Protein-Interaktionen induziert:

- 1.) Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz in der einfachen Transfektion deuten darauf hin, daß es durch die Dimerisierung zu Interaktionen zwischen viralen Gag-Proteinen im Zytoplasma gekommen sein muß. Durch das Fehlen eines Membrantransportsignals finden diese Akkumulationen aber unabhängig von zellulären Strukturen im Zytoplasma statt, so daß granuläre Strukturen über den gesamten zytoplasmatischen Bereich verteilt sind (Abb. 29)
- 2.) Im Gegensatz dazu erkennt man in der Co-Transfektion mit pCMF2E nach Inkubation mit dem „Dimerizer“ perinukleäre Fluoreszenzanreicherungen in allen Transfektionen (Abb. 30). Dies ist ein Hinweis darauf, daß Wechselwirkungen zwischen den FKBP-Bindungsdomänen des membranständigen Src-FKBP(2)-Fusionsproteins und denen der FKBP(2)-Gag-Fusionsproteine induziert wurden. Auf diese Weise wurde ein indirekter Transport der viralen Gag-Polypeptide an zelluläre Membranen bewirkt.
- 3.) Die fehlende Syncytienbildung ist möglicherweise auf eine hohe Konzentration der Src-FKBP(2)-Proteine an der Plasmamembran zurückzuführen, da dieses Phänomen nur in der Co-Transfektion beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Durch den „Dimerizer“ ist es vermutlich auch zu Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Src-FKBP(2)-Fusionsproteinen gekommen.

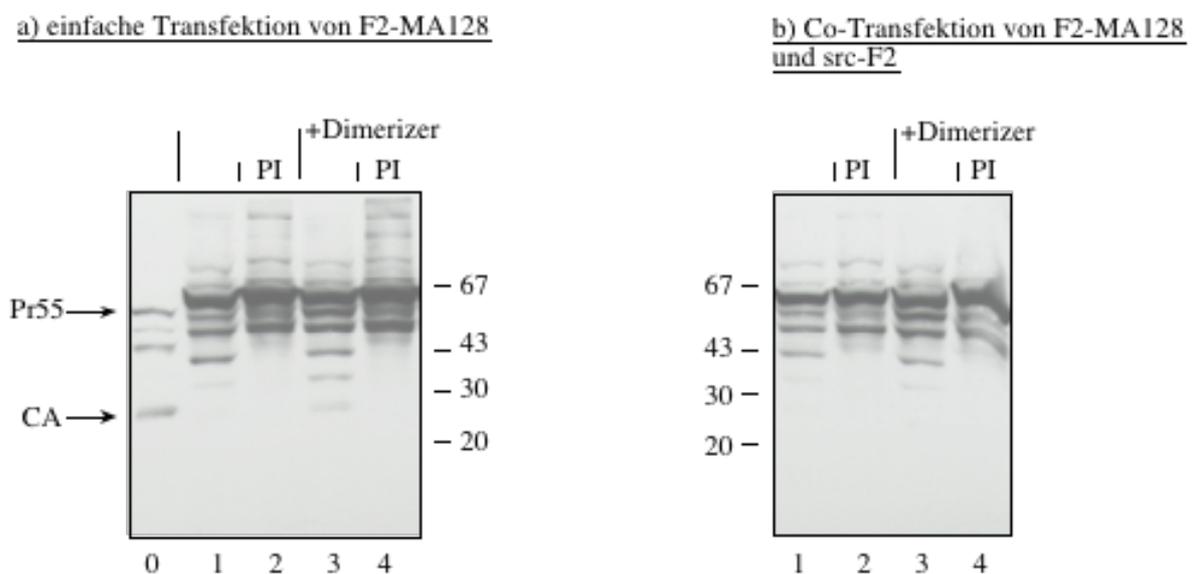
### **3.3.5. Biochemische Analyse der Partikelbildung**

Um festzustellen, ob nach einfacher Transfektion durch Dimerisierung virale Partikel gebildet werden können, wurde das Plasmid pHHR-FKBP(2)-MA128-TR transient in Hela Zellen transfiziert und die viralen Proteine vor und nach Inkubation mit dem „Dimerizer“ mit einem Antiserum gegen HIV-CA im Zellysat und im Zellüberstand detektiert. Darüber hinaus wurde der Einfluß eines Protease-Inhibitors auf die Detektion von Spaltprodukten der viralen Gag-Polypeptide überprüft. Dabei zeigte sich eine deutlich geringere Prozessierung der chimären Gag-Polypeptide im Vergleich zur wt-Kontrolle, wie bereits in Abb. 25 zu erkennen war (Abb. 31). Die geringe Prozessierung war jedoch spezifisch für die virale Protease, da die Prozessierung durch Saquinavir, einen spezifischen Protease-Inhibitor blockiert werden

konnte. Durch Zugabe des „Dimerizers“ kam es nicht zu einer Zunahme der intrazellulären Spaltprodukte der viralen Protease.

Nach Co-Transfektion von pCMF2E mit pHHR-FKBP(2)-MA128-TR zeigte sich in der Western Blot Analyse der Zellen ein weitgehend identisches Bild. Wiederum war eine geringe Prozessierung der viralen Gag-Polypeptide nachweisbar, die spezifisch für die virale Protease war. Die Zugabe des „Dimerizers“ führte aber auch in diesem Falle nicht zu einer signifikanten Verstärkung der Prozessierung.

### Zellextrakte des FKBP(2)-MA128-TR-Konstrukts



**Abb. 31) Western Blot Analyse der Zellysate nach einfacher Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR und nach Co-Transfektion mit pCMF2E**

Die Western Blot Analyse 24 h nach transienter Transfektion von HeLa Zellen mit pCMF2E und pHHR-FKBP(2)-MA128-TR erfolgte wie in der Legende zu Abb. 18 beschrieben. Analyse der Zellextrakte: Links ist die Expression des FKBP(2)-MA128-TR-Fusionsproteins nach einfacher Transfektion des kodierenden Plasmids, rechts nach Co-Transfektion mit pCMF2E dargestellt.

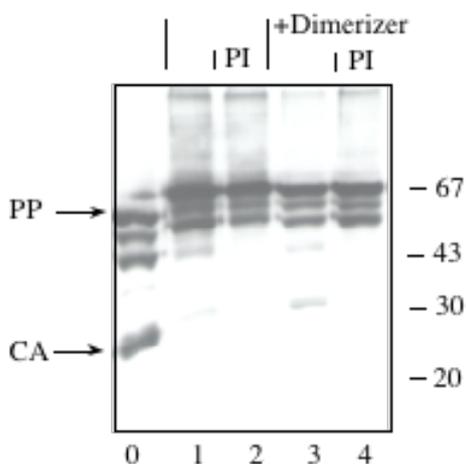
Spur 0 zeigt das Kontrollprotein HIV-TR, die Spuren 1 und 2 zeigen das FKBP(2)-MA128-TR-Protein ohne Inkubation mit dem „Dimerizer“. Spur 1 zeigt die FKBP(2)-MA128-TR-Proteine ohne, Spur 2 nach Inkubation der Zellen mit dem Protease-Inhibitor. Spur 3 und 4 zeigen die Fusionsprotein nach 4 h Inkubation mit dem „Dimerizer“ (3 ohne Protease-Inhibitor, 4 mit Protease-Inhibitor).

Die Analyse der Partikelfraktion erfolgte nach Pelletierung des Zellüberstandes durch ein 20%iges Saccharosekissen mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel und Detektion der viralen Proteine mit einem Antiserum gegen HIV-CA. Nach einfacher Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR fand sich eine signifikante

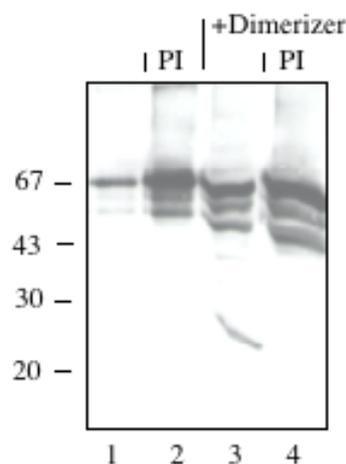
Menge an Gag in der Partikelfraktion, die nach Zugabe des „Dimerizers“ nicht zunahm (Abb. 32). Nach Co-Transfektion mit pCMF2E zeigte sich in der Partikelfraktion ein schwaches Signal für Partikel-assoziiertes Gag-Polypeptid. Nach Zugabe des „Dimerizers“ trat ein deutlich stärkeres Signal auf und zusätzlich war deutlich mehr prozessiertes CA-Protein nachweisbar. Diese vermehrte Freisetzung war bei gleichzeitiger Gabe von Saquinavir nicht zu beobachten.

### Pelletierung des Überstandes nach Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR

a) einfache Transfektion von F2-MA128



b) Co-Transfektion von F2-MA128 und src-F2



**Abb. 32) Western Blot Analyse des Zellüberstandes nach einfacher Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR und nach Co-Transfektion mit pCMF2E**

Die Western Blot Analyse 24 Stunden nach transienter Transfektion von HeLa Zellen mit den oben genannten Konstrukten erfolgte wie in der Legende zu Abb. 18 beschrieben. Die Analyse der Zellüberstände erfolgte nach Pelletierung bei 30000 rpm. Spur 1 und 2 zeigen die Proteine ohne Inkubation mit dem „Dimerizer“, ohne (1) und mit (2) Protease-Inhibitor. Spur 3 und 4 nach 4 h Inkubation mit dem „Dimerizer“, wiederum ohne (3) und mit (4) Protease-Inhibitor.

Diese Experimente zeigen, daß nach einfacher Transfektion des pHHR-FKBP(2)-MA-128-TR Konstrukts virale Proteine in der Partikelfraktion nachweisbar sind. Die Effizienz der Partikelfreisetzung und der Umfang der Prozessierung von Gag sind allerdings relativ gering. Möglicherweise sind diese Befunde auf Vesikel zurückzuführen, die aus transfizierten Zellen hervorgegangen sind und in denen die entsprechenden Proteine unspezifisch assoziiert vorliegen (Guschankof et al., 1997). Derartige Vesikel sind als Kontaminationen von HIV-Präparationen lange bekannt und könnten bei geringer spezifischer Partikelfreisetzung das

Signal komplett überdecken. In der Co-Transfektion bewirkt die Zugabe des „Dimerizers“ allerdings eine deutlich vermehrte Freisetzung von Gag-Polyproteinen sowie eine vermehrte Prozessierung, so daß es hier zu einem spezifischen Transport der viralen Proteine an die Membran gekommen sein muß. Um diese Vorgänge weiter zu charakterisieren, wurden ultrastrukturelle Untersuchungen durchgeführt.

### **3.3.6. Morphologische Untersuchung der gebildeten Partikel**

Um die Morphologie der gebildeten Strukturen zu untersuchen, wurden Hela Zellen nach einfacher Transfektion mit pHHR-FKBP(2)-MA128-TR und nach Co-Transfektion mit pCMF2E jeweils mit und ohne „Dimerizer“ mit Hilfe des Elektronenmikroskops analysiert. Diese Analyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. G. Rutter durchgeführt.

Artefakte, die möglicherweise durch die Transfektion oder die Inkubation mit dem „Dimerizer“ hervorgerufen werden können, sollten vor Beginn der Experimente systematisch ausgeschlossen werden. Daher wurden zunächst Hela Zellen vor und nach einer vierstündigen Inkubation mit AP1510 auf strukturelle Veränderungen hin untersucht. Weiterhin wurden Zellen in Abwesenheit von DNA mit Transfektionsmix inkubiert und vor und nach Inkubation mit dem „Dimerizer“ auf intrazelluläre morphologische Besonderheiten hin analysiert. In beiden Fällen konnten in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Veränderungen der Zellstruktur beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

In der einfachen Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR ließen sich bereits ohne Zugabe des „Dimerizers“ intrazellulär lokalisierte, virusähnliche, partikuläre Strukturen nachweisen. In vielen Fällen waren diese allerdings nicht vollständig geschlossen oder glichen halbmondförmigen Ausknospungen an intrazellulären Membranen. Durch die Zugabe des „Dimerizers“ änderte sich nichts am Erscheinungsbild. An der Plasmamembran fanden sich nach einfacher Transfektion keine Veränderungen.

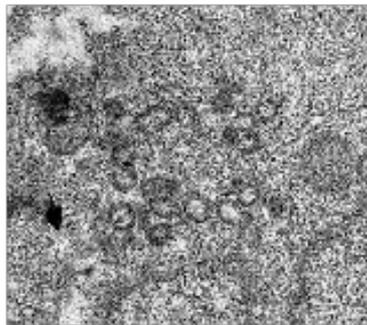
In der Co-Transfektion des pHHR-FKBP(2)-MA128-TR-Plasmids mit pCMF2E zeigten sich die gleichen morphologischen Veränderungen in Form partikulärer Strukturen wie bereits für die einfache Transfektion beschrieben. Allerdings konnte nach Zugabe des „Dimerizers“ eine deutliche Zunahme dieser Strukturen beobachtet werden (Abb. 33). Auch morphologisch ergaben sich Unterschiede. Die gebildeten Partikel hatten eine definierte Größe und waren weitgehend geschlossen. Darüber hinaus zeigten sich aber in Form und Größe sehr heterogene vesikuläre Abschnürungen und Verdichtungen an der Plasmamembran. In einigen Fällen handelte es sich dabei um virusähnliche Strukturen, andere glichen eher großen Vesikeln. Die

intrazellulär gelegenen Partikel waren homogener in Größe und Form und entsprachen eher dem Phänotyp eines normalen HI-Viruspartikels. Diese zwei Befunde bezüglich der betroffenen Zellen unterschieden sich sehr, was zu der Überlegung führte, daß die partikulären Strukturen an der Plasmamembran – zumindest teilweise – nicht durch das virale Gag bedingt sind.

Aus diesem Grund wurde eine einfache Transfektion von pCMF2E durchgeführt und die Zellen wurden auf Veränderungen intrazellulärer Membranen und der Plasmamembran hin untersucht (Abb 34). Ohne „Dimerizer“ zeigten sich vereinzelt Verdickungen der Plasmamembran. Nach Inkubation mit dem „Dimerizer“ zeigten sich die in der Co-Transfektion beobachteten heterogenen Knospungsstrukturen an der Plasmamembran mit Ähnlichkeit zu retroviralen Partikeln. Allerdings variierten die partikulären Strukturen in Form und Durchmesser.

**Co-Transfektion von HHR-FKBP(2)-MA128-TR und pCMF2E und Inkubation mit dem „Dimerizer“**

**HHR-FKBP(2)-MA128-TR mit Src-FKBP(2)**

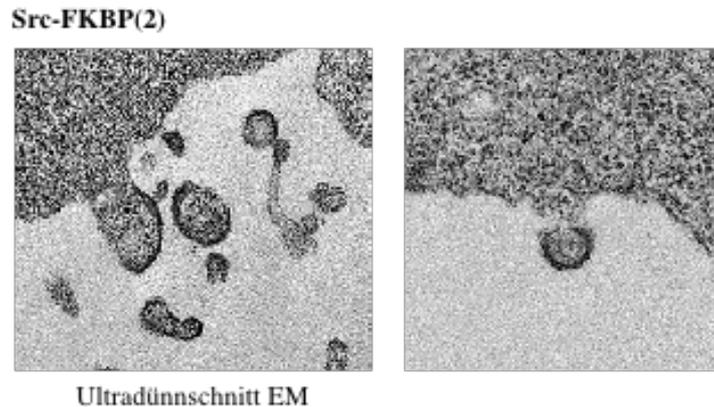


Ultradünnschnitt EM

**Abb. 33) Elektronenmikroskopische Analyse der Partikelbildung nach Co-Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR mit pCMF2E und Inkubation mit AP1510**

Die Co-Transfektion wurde in Hela Zellen durchgeführt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 4 h mit AP1510 inkubiert, anschließend fixiert und im Elektronenmikroskop analysiert. Dargestellt sind die zellulären Strukturen in Ultradünnschnitt-Technik .

### Einfache Transfektion mit pCMF2E und Inkubation mit dem „Dimerizer“



#### **Abb. 34) Elektronenmikroskopische Analyse der Partikelbildung nach Transfektion von pCMF2E und Inkubation mit AP1510**

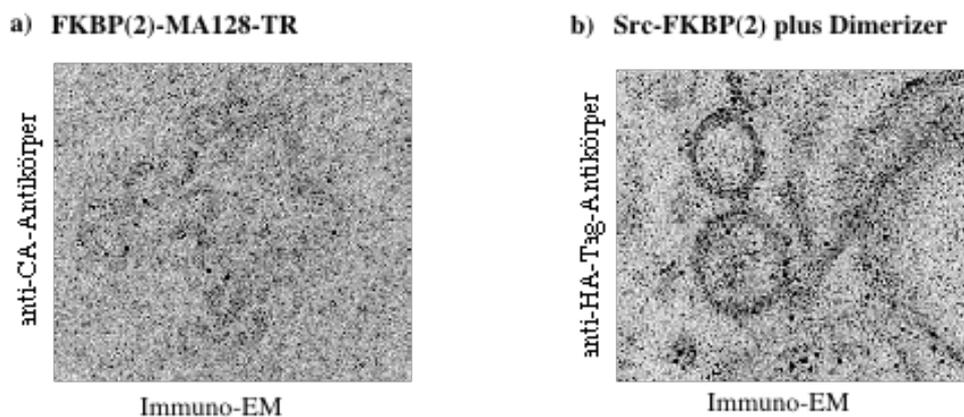
Die Transfektion wurde in Hela Zellen durchgeführt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 4 h mit AP1510 inkubiert und fixiert. Anschließend wurden die Zellen im Elektronenmikroskop analysiert. Dargestellt sind die zellulären Strukturen in Ultradünnschnitt-Technik .

Zur Klärung der Genese der beobachteten Strukturen wurden Immunomarkierungen an elektronenmikroskopischen Schnitten durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte mit einem polyklonalen Antiserum gegen HIV-CA sowie einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Tag des Src-FKBP(2)-Proteins inkubiert. Die Erstantikörper wurden mit unterschiedlich großen Gold-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Es wurden auf diese Weise jeweils eine einfache Transfektion der Konstrukte pHHR-FKBP(2)-MA128-TR und pCMF2E sowie eine Co-Transfektion mit beiden Plasmiden analysiert. Alle drei Ansätze wurden sowohl ohne „Dimerizer“, als auch nach vierstündiger Inkubation mit dem „Dimerizer“ auf Membranveränderungen hin untersucht.

Die einfache Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR zeigte nur intrazellulär gelegene partikuläre Strukturen und keine Veränderungen an der Plasmamembran (Abb. 35a). In der Co-Transfektion beider Plasmide und der einfachen Transfektion von pCMF2E zeigten sich nach Inkubation mit AP1510 die bereits beschriebenen typischen Verdickungen der Zellmembranen mit weitläufigen Membranablösungen und kleineren Veränderungen, die strukturell an die Ausknospung von Viren erinnerten (Abb. 35b). Durch die Immunomarkierungen konnten die Strukturen in zwei Gruppen unterteilt werden. Die intrazellulären partikulären Strukturen definierter Größe bildeten eine Gruppe. Sie waren durch eine hohe Konzentration an Anti-CA-Markierungen gekennzeichnet und hatten auch morphologisch große Ähnlichkeit mit unreifen Viruspartikeln. Die zweite Gruppe umfaßte die

heterogenen Veränderungen der Plasmamembran und zeichnete sich durch eine Markierung für Src-FKBP(2) aus.

**Immuno-EM der jeweils einfach transfizierten Plasmide pHHR-FKBP(2)-MA128-TR und pCMF2E**



**Abb. 35) Immunomarkierungen der Dünnschnitte von FKBP(2)-MA128-TR und Src-FKBP(2) exprimierenden Zellen nach Inkubation mit dem „Dimerizer“.**

**a)** Hela Zellen nach transienter Transfektion mit pHHR-FKBP(2)-MA128-TR und Inkubation mit dem „Dimerizer“ AP1510 für 1 Stunde. Anschließende Fixierung, Markierung der Fusionsproteine mit einem Antikörper gegen HIV-CA und elektronenmikroskopische Analyse **b)** Immuno-EM nach einfacher Transfektion von Src-FKBP(2) und Inkubation mit AP1510 für 1 Stunde. Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Tag.

Aus den morphologischen Untersuchungen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie geht hervor, daß schon allein die Akkumulation viraler Gag-Proteine im Zytoplasma zur Bildung unvollständiger, virusähnlicher partikulärer Strukturen führen kann. Durch Co-Transfektion mit pCMF2E kommt es dann offensichtlich zu einem spezifischen Transport der viralen Gag-Proteine an zelluläre Membranen. Dadurch wird die Bildung viraler Partikel verstärkt.

Die Experimente zeigen auch, daß Src-FKBP(2) alleine nach Zugabe von AP1510 Knospungsstrukturen ausbilden kann, die Ähnlichkeit mit viralen Partikeln haben. Zwischen den einzelnen membranständigen Src-FKBP(2)-Proteinen werden durch Zugabe des „Dimerizers“ Protein-Protein-Wechselwirkungen ausgebildet. Das führt, ähnlich der viralen Morphogenese, zur Ausbildung partikulärer Strukturen, welche allerdings in Form und Größe stark variieren.

Durch die hohe Konzentration der Src-FKBP(2)-Fusionsproteine waren nur sehr wenig Budding-Strukturen viralen Ursprungs an der Plasmamembran nachweisbar.

## **4. Diskussion**

Die Behandlung viraler Erkrankungen bedeutet auch heute noch eine große Herausforderung für die medizinische und molekularbiologische Forschung. Aufgrund der hohen Anpassung des viralen Vermehrungsweges an zelluläre Mechanismen ist es notwendig, diesen zu verstehen, um Wirkstoffe zu finden, die mit hoher Selektivität die Virusvermehrung beeinflussen. Obwohl viele Einzelheiten des molekularbiologischen Hintergrunds und der Pathogenese retroviraler Infektionen bereits bekannt sind, ist es bis heute nicht gelungen, die zunehmende Zahl der Erkrankungen zu reduzieren oder die Infektion bei bereits erkrankten Personen dauerhaft zu kontrollieren. Die Zahl der an AIDS-Erkrankten liegt derzeit in ihrem prozentualen Anteil an Infektionskrankheiten an der Spitze und überschreitet dabei die Anzahl der Tuberkulose- und Malaria-Erkrankten zusammen (WHO, Report 2000). Nur durch noch genauere Kenntnisse der funktionellen Bedeutung bestimmter Abschnitte innerhalb des viralen Genoms und des retroviralen Replikationsvorgangs bieten sich neue Angriffsmöglichkeiten für eine langfristige Therapie oder auch eine vollständige Heilung der Erkrankung.

Um die nach Infektion durch HIV ablaufenden Vorgänge in der Zelle für Analysen zugänglicher zu machen, wurde in dieser Arbeit eine neue Methode eingeführt. Diese beruht auf einem durch Dimerisierung induzierten, kontrollierten und synchronisierten Transport retroviraler Strukturproteine an die Plasmamembran. Auf diese Weise soll die Funktion des HIV-MA-Proteins ersetzt werden und ein wichtiger Abschnitt in der Vermehrung von HIV, welcher die Bildung und Freisetzung viraler Partikel aus der infizierten Zelle erst ermöglicht, manipuliert werden. Nach dem Transport und der Bindung der viralen Polyproteine an die Plasmamembran, kommt es dort zu Interaktionen zwischen den einzelnen Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteinen, wobei die CA-Proteine untereinander die stärksten Wechselwirkungen ausbilden. Über Zinkfinger motive und flankierende basische Aminosäuren der NC-Anteile im Gag- bzw. Gag-Pol-Vorläuferprotein werden die viralen RNA-Genome gebunden und verpackt. Diese Schritte im viralen Replikationszyklus sind essentiell für die Ausbildung von „Budding“-Strukturen und die Freisetzung viraler Partikel von der Plasmamembran der Zelle. Die Dimerisierungsmethode bietet in diesem Zusammenhang erstmalig die Möglichkeit eines konditionalen Membrantransports retroviraler Strukturproteine, induziert durch die Zugabe des „Dimerizer“ AP1510.

#### 4.1. Membrantransport und Bildung reifer Viruspartikel durch HIV-MA-IAP-Chimäre

Wie bereits beschrieben, spielt das HIV-MA-Protein eine entscheidende Rolle bei dem Transport der Gag-Vorläuferproteine an die Plasmamembran, sowohl durch die Myristilierung eines N-terminal gelegenen Glycin-Restes, als auch durch eine Anzahl basischer Aminosäuren N-terminal. Diese Ergebnisse stammen aus Deletionsstudien, welche durchgeführt wurden, um für den Membrantransport wichtige Bereiche innerhalb des MA-Proteins zu kartieren (zusammengefaßt von Kräusslich und Welker, 1996). In den murinen IAPs findet kein Transport der Gag-Polyproteine an die Plasmamembran statt. Das N-terminal gelegene Transportsignal dirigiert die viralen Strukturproteine an die Membranen des ER. Dort kommt es zu Interaktionen der Proteine untereinander, Ausbildung von „Budding“-Strukturen und Freisetzung unreifer Viruspartikel in intrazelluläre Zisternen. In den durchgeführten Experimenten sollte die funktionelle Austauschbarkeit dieser sequenziell wenig homologen Membrantransportdomänen überprüft werden. Darüber hinaus sollte die für einen effizienten Plasmamembrantransport der IAPs benötigte minimale N-terminale HIV-MA-Sequenz bestimmt werden.

Verschiedene Arbeiten hatten bereits gezeigt, daß ein heterologes Membrantransportsignal Gag-Vorläuferproteine von Retroviren an die Plasmamembran dirigieren kann. Wills war es durch Hinzufügen eines Myristilierungssignals an den N-Terminus des Rous-Sarcoma-Virus Gag-Proteins (Pr76gag) gelungen effiziente Virusbildung in Säugetierzellen zu erreichen (Wills et al., 1989). Welker konnte zeigen, daß nach Austausch des Membrantransportsignals der endogenen murinen IAPs mit einem heterologen Myristilierungssignal (Src) ein Transport an die Plasmamembran stattgefunden hatte und es darüber hinaus zu einer Freisetzung der IAPs ins extrazelluläre Medium gekommen war (Welker et al., 1997). Dies hatte offensichtlich zur Aktivierung der viralen Protease geführt. Auch Chimäre zwischen unterschiedlichen Virusgruppen, wie der Austausch des MA-Proteins eines Onkovirus (MuLV) durch das MA-Protein eines Lentivirus (HIV-1) zeigte, waren in der Lage infektiöse Partikel zu bilden (Deminie und Emerman, 1994). Eine Wiederherstellung der Membrantransportfunktion einer MA defekten Rous-Sarkoma-Virus-Mutante mit Hilfe unterschiedlich langer Abschnitte N-terminal gelegener Sequenzen des HIV-MA-Proteins konnte Bennett in seiner Arbeit demonstrieren (Bennett et al., 1993).

Diese Experimente bildeten die Grundlage für die Überlegung chimäre HIV-MA-IAP-Proteine herzustellen. Durch den Austausch der N-terminalen 28 Kodons von Mia2-MA bzw. 2/3 der Mia2-MA-Sequenz durch für HIV-MA kodierende Regionen unterschiedlicher Länge

(Abb. 10) wurden die chimären Gag-Proteine an die Plasmamembran transportiert und eine Freisetzung und Reifung der viralen Partikel erreicht (Abb. 13). Allerdings waren trotz der unterschiedlich langen Anteile des HIV-MA-Proteins in den einzelnen Konstrukten keine Unterschiede in der Konzentration der freigesetzten und prozessierten Proteine erkennbar. Offensichtlich können also HIV-MA-Sequenzen mit einer minimalen Länge von 24 N-terminal gelegenen Kodons, die Transportdomäne der IAPs funktionell substituieren. Sie bewirken aber keinen ausschließlichen und damit spezifischen Transport der viralen Gag-Polyproteine an die Plasmamembran. Dies wurde in der indirekten Immunfluoreszenz deutlich. Nach Transfektion von pHHR-Mia4 war eine deutliche Fluoreszenzanreicherung an der Plasmamembran erkennbar (Abb. 12, unten). Die chimären HIV-IAP-Fusionsproteine akkumulierten in unmittelbarer Nähe des Zellkerns, an intrazellulären Membranen (Abb. 12, oben). Mit zunehmender Länge des HIV-MA-Anteils und Verkürzung der IAP-MA-Sequenz änderte sich die Verteilung der HIV-IAP-Fusionsproteine von einer intranukleär, zytoplasmatischen Verteilung (HM-2n) zu perinukleären Akkumulationen mit vollständiger Aussparung des Zellkerns (HM-5n).

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die Membrantransportdomäne des HIV-MA-Proteins im Kontext des HIV-Gag-Polyproteins besser exponiert ist und auf diese Weise einen spezifischen Transport an die Plasmamembran bewirken kann (Zhou und Resh, 1996). Im Kontext der HIV-MA-IAP-Chimäre könnte dieses Signal, bedingt durch die veränderte Tertiärstruktur des Proteins, teilweise verdeckt sein. Dabei spielt die Länge der HIV-MA-Sequenz eine entscheidende Rolle für die Fähigkeit zur Verankerung der Fusionsproteine in zellulären Membranen (Abb. 12).

HM-6n unterschied sich deutlich von den anderen Konstrukten, da nach Transfektion dieses Plasmids Fluoreszenzanreicherungen an der Plasmamembran und an der Kernmembran zu beobachten waren. Dieser Phänotyp deutete darauf hin, daß durch die Kombination aus der 30 Kodons umfassenden N-terminalen Region der HIV-MA-Sequenz und der N-terminalen Region des verbliebenen IAP-Gag ein Kerntransportsignal generiert worden war.

Die Konzentrationen der freigesetzten viralen Partikel nach Transfektion der HIV-MA-IAP-Plasmide lagen noch deutlich unter der des pHHR-Mia4 Kontrollplasmids. Das Membrantransportsignal des Src-Proteins hat offensichtlich im Vergleich zum N-terminalen Bereich des HIV-MA-Proteins im Kontext der HIV-IAP-Chimäre ein deutlich höheres Potential für den Transport der viralen Strukturproteine innerhalb der Zelle.

Nach Transfektion der für eine Punktmutation im aktiven Zentrum der viralen Protease kodierenden Plasmide (Abb. 13) zeigte die Analyse der Zellysate, daß keine Prozessierung

der Gag-Polyproteine und damit Reifung der Viruspartikel stattgefunden hatte. Dies war auch ein Hinweis darauf, daß es nach Expression der Fusionsproteine nach Transfektion von HM-2n, HM-4n, HM-5n und HM-6n an der Plasmamembran zu einer spezifischen Aktivierung der viralen Protease gekommen war.

#### **4.2. Dimerisierung als intrazelluläres Membrantransportsystem**

Viele intrazelluläre Prozesse werden durch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Das Prinzip der Dimerisierung bietet die Möglichkeit kontrollierte Wechselwirkungen der Proteine untereinander herbeizuführen und somit spezifische Signaltransduktionen, Proteintransport oder Gentranskription unabhängig von intrazellulären Prozessen zu induzieren. In verschiedenen Arbeiten wurden auf der Grundlage dieses Prinzips bereits zelluläre Prozesse kontrolliert modifiziert.

Ulrich machte die Beobachtung, daß eine durch spezifische Antikörper hervorgerufene Homodimerisierung von Wachstumsfaktoren in deren Aktivierung resultierte (Ulrich und Schlessinger, 1990). Diese Experimente bildeten die Grundlage für die Entwicklung der Dimerisierungsmethode. Nach Austausch der extrazellulären und transmembranen Domänen membranständiger Proteine mit dem Membrantransportsignal des Src-Proteins und der Bindungsdomäne eines FKBP-Proteins bot sich durch Zugabe eines zellpermeablen „Dimerizers“ die Möglichkeit der Induktion von intrazellulären Protein-Protein-Interaktionen. Spencer konnte auf diese Weise für die  $\alpha$  Kette des T-Zell Antigen-Rezeptor-Komplexes (TCR) und die MB-1-Kette des Immunglobulin-Rezeptor-Komplexes zeigen, daß eine Liganden-unabhängige Aktivierung der Rezeptoren möglich ist. Durch Austausch der transmembranen Region mit einer FKBP-Bindungsdomäne bewies er, daß lediglich die Protein-Protein-Interaktionen in Form einer Homodimerisierung und die Nähe der Rezeptoren zur Zellmembran für deren Aktivierung essentiell sind (Spencer et al., 1993). Der in diesen Experimenten verwendete „Dimerizer“ FK1012, der aus zwei durch einen Linker miteinander verbundenen FK506 Molekülen bestand, zeichnete sich bereits durch metabolische Stabilität, gute Lipidlöslichkeit, fehlende Zelltoxizität und eine hohe Affinität zu seinem Zielmolekül FKBP12 aus. Die Größe und Komplexität des Moleküls veranlaßten jedoch Amara zu der Entwicklung von AP1510, einem neuen, einfach zu synthetisierenden Molekül mit Bindungseigenschaften analog zu denen des FK1012 (Amara et al., 1997).

Diese und folgende Versuche belegten die Anwendbarkeit der Dimerisierungsmethode zur Manipulation intrazellulärer Prozesse durch Homodimerisierung benachbarter

membranständiger Proteine (Belshaw et al., 1996; Amara et al., 1999). Ein durch Dimerisierung induziertes „Targeting“ retroviraler Strukturproteine zur Plasmamembran war in der Literatur bislang nicht beschrieben. Anhand eines leicht zu analysierenden Systems sollten daher zunächst Bindungskinetik und zeitlicher Ablauf des Transports untersucht werden. Dazu wurde das Gen des Grün Fluoreszierenden Proteins von *Aquaeformis victoria* (GFP) an den C-Terminus von Sequenzen fusioniert, die für jeweils eine bzw. zwei FKBP-Domänen kodierten (Abb. 16). Nach Expression der Fusionsproteine zeigten diese eine hohe Affinität zum Zellkern (Abb. 18). Die Zugabe des „Dimerizers“ änderte das Erscheinungsbild der für FKBP(2)-GFP exprimierenden Zellen in der Immunfluoreszenz. Es kam zu großen granulären Proteinakkumulationen im Zytoplasma, insbesondere in der Nähe des Zellkerns (Abb. 20). Es kann davon ausgegangen werden, daß sich das FKBP(2)-GFP-Fusionsprotein in permanenter Bewegung zwischen Kern und Zytoplasma befindet. Durch die „Dimerizer“-induzierten Protein-Protein-Wechselwirkungen und die daraus resultierende große Komplexität der Moleküle wurde offensichtlich ein Rücktransport der FKBP(2)-GFP-Proteine aus dem Zytoplasma in den Kern verhindert.

Auch in co-transfizierten Zellen konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz die Wirkung des „Dimerizers“ bestätigt werden. Ohne Inkubation mit AP1510 war für beide FKBP-GFP-Fusionsproteine das gleiche Verteilungsmuster wie in der einfachen Transfektion zu beobachten (Abb. 21, oben). Die Src-FKBP(2)-Fusionsproteine zeigten eine hohe Affinität zu intrazellulären Membranen und zur Plasmamembran (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe des „Dimerizers“ führte zu einer Umverteilung der FKBP(2)-GFP-Fusionsproteine in den co-transfizierten Zellen (Abb. 21, oben). Nach ca. einer Stunde war in 95% der Zellen membranassoziierte GFP-Lokalisation, wie sie auch für das Kontrollprotein Src-GFP beobachtet werden konnte, nachweisbar (Abb. 21, unten). Damit konnte gezeigt werden, daß der „Dimerizer“ indirekt einen Transport der Fusionsproteine an zelluläre Membranen bewirkt hatte. Die beschriebenen Änderungen in der Lokalisation konnten allerdings ausschließlich nach Transfektionen von Konstrukten mit zwei FKBP-Bindungsdomänen (FKBP(2)-GFP) gesehen werden. Diese Beobachtung sprach dafür, daß das Vorhandensein von zwei FKBP-Bindungsdomänen die Wahrscheinlichkeit von Interaktionen mit dem „Dimerizer“ stark erhöht und bildete somit eine wichtige Grundlage für weitere Experimente. In der Analyse der verschiedenen Inkubationszeiten zeigte sich, daß in den einzelnen Zeitfenstern keine Zwischenstufen in der Umverteilung der FKBP(2)-GFP-Fusionsproteine darstellbar waren. Mögliche Gründe dafür wären eine sehr schnelle Lokalisationsänderung der Fusionsproteine nach Aufnahme des „Dimerizers“ oder die begrenzte Differenzierbarkeit

diskreter Unterschiede der intrazellulären Verteilung in der Analyse durch die Immunfluoreszenz.

### **4.3. Kontrollierter Membrantransport retroviraler Strukturproteine**

Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, daß durch die Dimerisierungsmethode eine deutlich sichtbare Lokalisationsänderung der FKBP(2)-GFP-Fusionsproteine innerhalb der Zelle erreicht werden kann. Es sollte nun überprüft werden, ob diese Methode ebenfalls geeignet ist, einen kontrollierten Membrantransport retroviraler Strukturproteine zu induzieren und somit Partikelfreisetzung zu ermöglichen. Deletionsstudien mit anderen Retroviren wie MPMV und MLV hatten, vermutlich aufgrund von Störungen der Proteinfaltung, zu instabilen Polyproteinen geführt (Jorgensen et al., 1992; Rhee und Hunter, 1990; Granowitz und Goff, 1994). Deshalb wurden zur Überprüfung dieser Hypothese zwei sehr unterschiedliche retrovirale Systeme ausgewählt, und die Membrantransportdomänen von HIV und dem endogenen murinen IAP (Mia2) durch FKBP-Domänen ersetzt (Abb. 22 und 26). Der induzierte Membrantransport und die dadurch erlangte Kontrolle über den Ablauf des viralen Replikationszyklus sollte eine Aussage zum Zeitpunkt der Aktivierung der viralen Protease durch morphologische Studien im Elektronenmikroskop ermöglichen.

#### **IAP-Gag**

Trotz des erfolgreichen Nachweises der FKBP-IAP-Fusionsproteine mittels Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen nach einfacher Transfektion der entsprechenden Plasmide (Abb. 23 und 24) konnten in der Co-Transfektion mit pCMF2E keine viralen Proteine mehr detektiert werden. Möglicherweise war es zu einer kompetitiven Hemmung der IAP-Proteinsynthese durch die Synthese des Src-FKBP(2)-Fusionsproteins gekommen, da auch bei Änderung der Konzentrationsverhältnisse zwischen pCMF2E- und FKBP-IAP-Plasmid-DNA keine Änderung im Erscheinungsbild zu erkennen war. Die Expression von Src-FKBP(2) konnte in allen Transfektionen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

#### **HIV-Gag**

Ein ähnlicher Ansatz wie für das endogene Retrovirus Mia2 wurde für HIV gewählt. Der Transport der retroviralen Strukturproteine an die Plasmamembran wird im Falle von HIV durch Myristilierung von MA (Göttlinger et al., 1989; Bryant and Ratner, 1990;) und eine ca. 30 Kodons umfassende Region im N-terminalen Teil der von HIV-MA vermittelt (Yuan et

al., 1993; Zhou et al., 1994). Mutationen innerhalb des MA-Proteins können bei HIV und anderen Retroviren das zelluläre Zielkompartiment des Transports (Rhee und Hunter, 1990; Facke et al., 1993; Ono et al., 2000) und die „Assembly“-Eigenschaften verändern (Rhee und Hunter, 1991). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, daß der Austausch der gesamten HIV-MA-Sequenz durch ein Membrantransportsignal, wie z.B. das des Src-Proteins, die Transportfunktion innerhalb des viralen Polyproteins wieder herstellen und eine effiziente Virusreplikation ermöglichen kann (Lee und Linial, 1994; Reil et al., 1998).

Diese Ergebnisse waren ein Hinweis darauf, daß auch die Dimerisierungsmethode als Transportsystem geeignet sein könnte. Der Vorteil dieser Methode würde darin bestehen, die Synthese der viralen Polyproteine von dem unmittelbar folgenden Transport an die Plasmamembran und damit der Abschnürung von Viruspartikeln abzukoppeln. Erst die Zugabe des „Dimerizers“ sollte einen Membrantransport induzieren und die weiteren Replikationsschritte synchronisieren.

Um diese Hypothese zu testen, wurden zwei HIV-Mutanten hergestellt, in welchen HIV-MA bis auf die letzten 12 bzw. 4 C-terminalen Kodons durch die Sequenzen von zwei FKBP-Bindungsdomänen ersetzt war (Abb. 25 und 26). Auf diese Weise war die Spaltstelle für die virale Protease noch zugänglich (Gross et al., 1997). Da für Partikelfreisetzung und Prozessierung Gag und Pol ausreichend sind (Gheysen et al., 1989), bestanden die anfangs verwendeten Konstrukte aus FKBP(2)-MA120/128-gag-pol (Abb. 25). In diesem Kontext war eine Rev-RRE unabhängige Expression der Gag-Polyproteine möglich (Wodrich, Dissertation). Allerdings zeigte sich in Immunfluoreszenz-Analysen der Konstrukte, daß die Rev-unabhängige Expression von Gag und Pol gegenüber der Expression der gesamten HIV-Sequenz deutlich reduziert war (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse hatten zur Folge, daß die FKBP(2)-MA120/128 Mutanten in den proviralen Kontext von pNL4-3 umklontiert wurden (Abb. 26).

Die neuen Konstrukte enthielten die gesamte kodierende Region von HIV, einschließlich des intakten Rev-RRE Systems. Es war ebenfalls bekannt, daß Manipulationen in MA die Glykoproteininkorporation beeinträchtigen würden. Daher wurde ein Konstrukt mit einer Verkürzung des langen zytoplasmatischen Anteils des Transmembranproteins verwendet, welches die Inkorporation des Env-Glykoproteins in Abwesenheit von HIV-MA ermöglichen würde (Wilk et al., 1992). Die neuen Konstrukte zeichneten sich durch eine hohe Transfektionseffizienz aus. In der Western Blot Analyse waren je nach Ausmaß der MA-Deletion unterschiedliche Größen der Fusionsproteine zu erkennen. Dies war ein Hinweis auf die Stabilität der Gag-Polyproteine. In der Immunfluoreszenz fanden sich keine Unterschiede

in der Verteilung der einzelnen FKBP-HIV-Fusionsproteinen, so daß die genauere Analyse von Partikelbildung und Freisetzung nur für das Konstrukt FKBP(2)-MA128-TR durchgeführt wurde (Abb. 28).

Nach der einfachen Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR konnten durch Immunfluoreszenz und im Western Blot intrazellulär virale Strukturproteine nachgewiesen werden (Abb. 28, 29, 31a). Möglicherweise war es sogar zur Virusfreisetzung gekommen, da auch in der Pelletierung des Überstandes virale Strukturproteine nachweisbar waren (Abb. 32a). Wahrscheinlicher ist allerdings, daß der Nachweis extrazellulärer viraler Strukturproteine auf Vesikel zurückzuführen ist, die aus transfizierten Zellen hervorgegangen sind und in denen die entsprechenden Proteine unspezifisch assoziiert vorlagen (Gluschankof et al., 1997). Das Phänomen der Vesikelbildung war bereits im Rahmen anderer Experimente beobachtet worden. Elektronenmikroskopische Analysen leukämischer Zellen zeigen gehäuft Zellmembranveränderungen dieser Art. Auch Schafretikulozyten (Pan et al., 1985) und humane B-Zell-Linien (Raposo et al., 1996) sezernieren kleine Vesikel, welche als Exosomen bezeichnet werden. Gluschankof konnte zeigen, daß in HIV-Viruspräparationen eine hohe Kontamination mit zellulären Proteinen in Form von Mikrovesikeln besteht (Gluschankof et al., 1997; Bess et al., 1997). Das Auftreten dieser vesikulären Abschnürungen der Zellmembran war allerdings nicht an eine Infektion der Zelle mit HIV-1 gebunden, sondern konnte auch in nichtinfizierten Zellen beobachtet werden. Die Ursache und die Bedeutung dieser Vesikelentstehung in normalen humanen Zellen ist noch nicht geklärt. Gluschankof diskutiert in seiner Arbeit eine verstärkte Eliminierung membranassoziierter Proteine bzw. einen Mechanismus der Antigenpräsentation. Das Auftreten von Vesikeln, welche sich in der Dichte deutlich von HIV-1-Viruspartikeln unterscheiden, wäre in diesem Sinne auf eine sehr hohe Konzentration an Proteinen oder Nukleinsäure zurückzuführen, die diese Partikel unstrukturiert erscheinen läßt.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der mit pHHR-FKBP-MA128-TR einfach transfizierten Zellen zeigten deutlich, daß sich trotz fehlenden Membrantransportsignals partikuläre Strukturen im Zytoplasma nachweisen ließen. Möglicherweise war es durch Akkumulation transportunfähiger Mutanten innerhalb der Zelle zur Bildung partikulärer Strukturen gekommen (Abb. 36a, Gheysen et al., 1989). Die FKBP-Domäne sollte als Fusionsprotein mit HIV keine Membrantransporteigenschaften aufweisen. Allerdings gibt es in der Literatur verschiedene Hinweise auf eine Bindung des Immunophilins FKBP12 an membranständige Rezeptoren, wie beispielsweise den „transforming growth factor beta“ TypI Rezeptor (Stockwell und Schreiber, 1998; Huse et al., 1999). Der „transforming growth factor

beta“ (TGF-beta) spielt eine wesentliche Rolle in der Wachstumsregulation von Zellen, indem er einen inhibierenden Effekt auf die meisten epithelialen Zellen ausübt. Offensichtlich ist FKBP12 nicht direkt an der Signalvermittlung beteiligt (Okadome et al., 1996). Es wäre aber möglich, daß die in den Dimerisierungsexperimenten verwendete FKBP-Domäne an TGF-beta TypI bindet und somit für die viralen Strukturproteine die unmittelbare Nähe zu zellulären Membranen herstellt. Durch die Nähe zur Plasmamembran und zu intrazellulären Membranen werden Protein-Protein-Interaktionen der membranständigen Gag-Polyproteine untereinander ermöglicht, was zur Ausbildung von „Budding“-Strukturen und intrazellulären virusähnlichen Partikeln führen könnte.

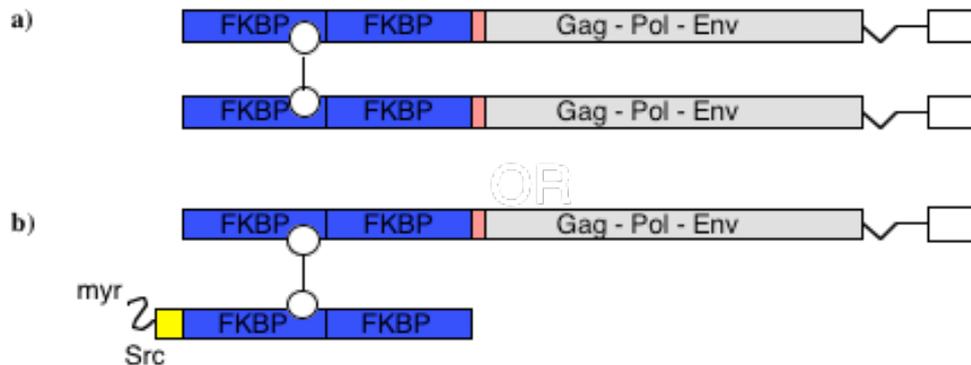
Die Zugabe des „Dimerizers“ nach einfacher Transfektion des oben genannten Plasmids führte zu einer Abnahme der Konzentration der viralen Proteine im Überstand (Abb. 32b). Dies deutet auf eine forcierte intrazelluläre Akkumulation der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine und damit eine reduzierte Freisetzung viraler Partikel aus der Zelle hin, da intrazellulär etwa die gleiche Konzentration an viralen Strukturproteinen vorlag wie in den Experimenten ohne Inkubation mit dem „Dimerizer“ (Abb. 31). Die Akkumulationen der viralen Strukturproteine zeigte sich auch sehr deutlich in der Immunfluoreszenz in Form granulärer Strukturen im Zytoplasma, welche in den Immunfluoreszenzanalysen ohne „Dimerizer“ nicht beobachtet werden konnten (Abb. 30).

Die Ergebnisse aus der Co-Transfektion von pHHR-FKBP(2)-MA128-TR mit pCMF2E sprachen für die Anwendbarkeit der Dimerisierungsmethode als Transportsystem innerhalb des viralen Replikationszyklus. Die Zugabe des „Dimerizers“ bewirkte eine Steigerung der Virusfreisetzung (Abb. 32b). Dies war ein Hinweis darauf, daß es zu Interaktionen des membranständigen Src-FKBP(2)-Proteins mit der Dimerisierungsdomäne des FKBP(2)-MA128-TR-Fusionsproteins gekommen war (Abb. 36a).

Die FKBP(2)-HIV-Fusionsproteine zeigten, wie bereits nach der Co-Transfektion von pHHR-FKBP(2)-GFP mit pCMF2E und Inkubation mit dem „Dimerizer“ beobachtet, starke Fluoreszenzanreicherungen perinukleär. Die Co-Lokalisation der FKBP(2)-HIV-Fusionsproteine und des Src-FKBP(2)-Proteins konnte in der Doppelimmunfluoreszenz bestätigt werden (Abb. 30). In der elektronenmikroskopischen Analyse der co-transfizierten Zellen korrelierte diese Beobachtung mit „Budding“-Strukturen an intrazellulären Membranen, wie z.B. dem ER, aber auch der Plasmamembran (Abb. 33).

Neben morphologisch konstanten partikulären Strukturen fanden sich „Budding“-Strukturen welche in der Länge stark variierten und als Verdichtungen der Plasmamembran und partiell auch intrazellulärer Membranen imponierten (Abb. 34). Weiterhin ließen sich vesikuläre

Ausknoipungen an der Plasmamembran beobachten. Diese morphologischen Besonderheiten waren nur nach Zugabe des „Dimerizers“ erkennbar. Die Immunomarkierung der elektronenmikroskopischen Schnitte zeigte in diesen Regionen eine auffällig hohe Konzentration an Src-FKBP(2).



**Abb. 36) Schematische Darstellung der Interaktion zwischen FKBP(2)-Fusionsproteinen und Src-FKBP(2) und FKBP(2)-Fusionsproteinen**

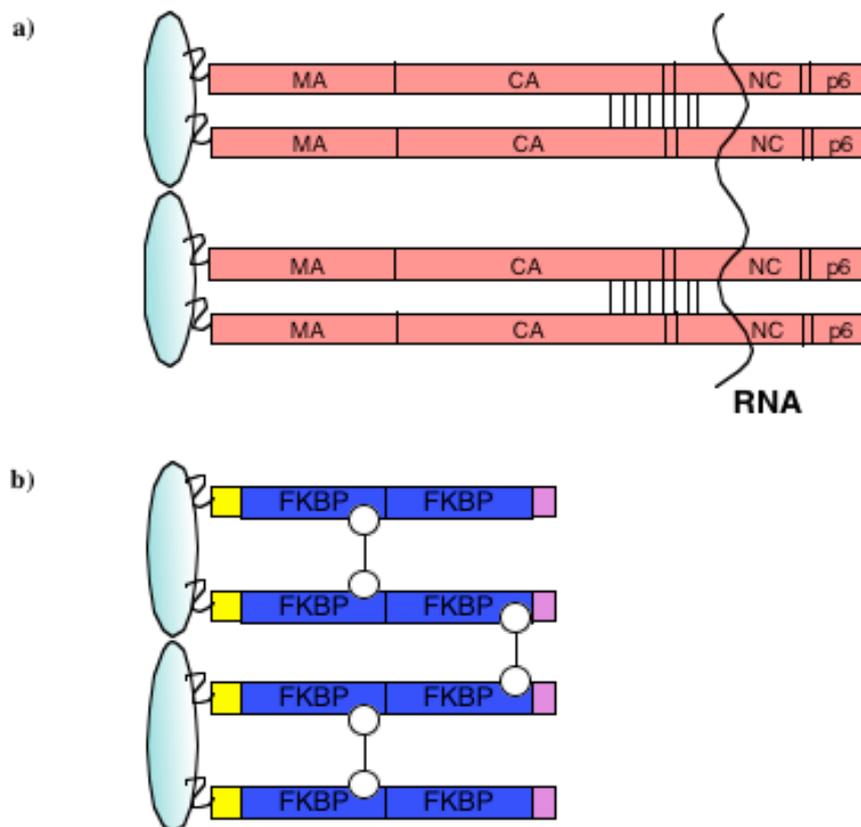
a) Interaktionen zwischen den FKBP(2)-HIV-Konstrukten werden durch die Homodimerisierung der FKBP-Bindungsdomänen durch AP1510 hervorgerufen und entsprechen im EM großen im Zytoplasma befindlichen Proteinaggregationen b) Interaktionen zwischen Src-FKBP(2) und FKBP(2)-HIV-Proteinen bilden die im EM beobachteten sphärischen Kapside, welche unreifen Virionen entsprechen

#### 4.4. Bildung und Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel aus nichtviralen Proteinen

Die in ihrer Ausdehnung stark variierenden Verdickungen und vesikulären Abschnürungen an der Plasmamembran in Verbindung mit nachweislich hohen Konzentrationen von Src-FKBP(2) in der Co-Transfektion mit pHHR-FKBP(2)-MA128-TR führten zu der Frage, ob durch Src-FKBP(2) allein unter Zugabe des „Dimerizers“ die Ausbildung von Ausknospungsstrukturen induziert werden kann. Durch einfache Transfektion des Konstrukts und immuno-elektronenmikroskopische Analysen konnte die Genese der membranösen Strukturen eindeutig auf die Inkubation der Src-FKBP(2)-Fusionsproteine mit dem „Dimerizer“ AP1510 zurückgeführt werden (Abb. 34 und 35b).

Im Unterschied zu der bereits im letzten Absatz beschriebenen Vesikelbildung zeigen die FKBP-Partikel eine elektronendichte Verdickung unter der Plasmamembran. Da ein sehr ähnliches Erscheinungsbild bei Expression von HIV-1-Gag-Mutanten mit einer Deletion in der Gag-„Assembly“-Region beobachtet wurde (Wiegers et al., 1998; Kräusslich et al., 1995), orientiert sich ein Erklärungsmodell für die beobachteten Veränderungen der Zellmembran an dem Ablauf der viralen Morphogenese. Die wesentlichen Schritte der Partikelbildung

umfassen den Membrantransport der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine, vermittelt durch die N-terminale Region innerhalb von MA, die Akkumulation der MA- und CA-Proteinanteile durch intermolekulare Wechselwirkungen zu elektronenmikroskopisch sichtbaren Bereichen entlang zellulärer Membranen und die Bindung des viralen RNA-Genoms durch bestimmte Abschnitte innerhalb des NC-Proteins (Abb. 37a). Das Src-FKBP(2)-Fusionsprotein ist nach Zugabe des „Dimerizers“ offensichtlich in der Lage zwei dieser drei Funktionen des viralen Gag-Polyproteins zu ersetzen. Das heterologe Membrantransportsignal des Src-Proteins dirigiert das Fusionsprotein zur Plasmamembran - vergleichbar mit der Transportdomäne retroviraler MA-Proteine. Die Zugabe des „Dimerizers“ vermittelt die Interaktionen der FKBP-Proteine untereinander - ähnlich der Wechselwirkungen, welche die viralen CA-Proteine untereinander ausüben (Abb. 37b).



**Abb. 36) Schematische Darstellung der durch den „Dimerizer“ induzierten Zusammenlagerung der Src-FKBP(2)-Proteine zu virusartigen Partikeln**

a) „Assembly“ unreifer HIV-Partikel beinhaltet folgende 3 Schritte: Bindung an die Plasmamembran (MA), Protein-Protein-Interaktionen (CA), unspezifische Nukleinsäurebindung (NC), späte Partikelfreisetzung (p6) b) Durch „Dimerizer“ induziertes „Assembly“ des Src-FKBP(2) imitiert Virusassembly durch die Bindung an die Plasmamembran (Src siehe MA) und Protein-Protein-Interaktionen (FKBP + „Dimerizer“ siehe CA)

Die morphologischen Untersuchungen durch elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten Unterschiede zwischen den partikulären Strukturen, welche nach Inkubation Src-FKBP(2) exprimierender Zellen mit dem „Dimerizer“ entstanden waren, und HIV-1 Viruspartikeln. Die freigesetzten Partikel unterschieden sich durch ihre heterogene Größe deutlich von viralen Partikeln. Dies ist möglicherweise auf das Fehlen C-terminaler funktioneller Anteile des Gag-Polyproteins zurückzuführen (zusammengefaßt von Craven und Parent, 1996). Unterschiede in der Partikelgröße konnten bereits im Rahmen von Mutationen und Deletionen des p6 Proteins bzw. der „Late“-Domäne verschiedener Retroviren gezeigt werden (Göttlinger et al., 1991; Garnier et al., 1998; Craven et al., 1999). Durch die Mutationen kommt es offensichtlich zur Störung der Interaktionen des HIV-1 p6 Proteins mit zellulären Faktoren, welche eine entscheidende Bedeutung bei der Abschnürung viraler Partikel haben (Puffer et al., 1997; Schubert et al., 2000).

Weitere Untersuchungen sollten daher klären, ob durch Hinzufügen einer Nukleinsäure bindenden Domäne im C-terminalen Bereich, wie NC, auf diesem Modell basierende virusartige partikuläre Strukturen aus nicht-viralen Bestandteilen entstehen können. Eine zusätzliche „Late“-Domäne könnte möglicherweise im Src-FKBP(2)-NC Kontext eine effiziente Abschnürung der viralen Partikel von der Plasmamembran in der späten Phase der viralen Morphogenese induzieren.

Auf diese Weise wäre es möglich die funktionellen Domänen innerhalb des Gag-Polyproteins durch virale oder nichtvirale heterologe Moleküle zu ersetzen und so nichtinfektiöse virusartige Partikel entstehen zu lassen (Puffer et al., 1997; Bowzard et al., 1998; Garnier et al., 1999). Der Partikelbildung ginge eine kontrollierte Induktion von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen FKBP-Domänen voraus, was die gute Steuerbarkeit dieses Systems gewährleisten würde. Diese „Designerviren“ könnten eine Alternative zum Einsatz viraler Vektoren im Rahmen der Gentherapie darstellen.

## **5. Zusammenfassung**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten die für den Membrantransport eines retroviralen Gag-Proteins minimal benötigte N-terminale Region in HIV-MA kartieren helfen. Es sollte weiterhin HIV-MA funktionell durch FKBP-Domänen ersetzt werden. Die gleichzeitige Expression eines FKBP-Fusionsprotein mit Membrantransportsignal und FKBP-HIV-Fusionsproteinen sollte nach Zugabe eines Dimerizers im Transport der viralen Proteine an die Plasmamembran resultieren. Dadurch sollten Erkenntnisse über den Ablauf der viralen Morphogenese gesammelt werden.

Zur Identifizierung der für einen Membrantransport minimal benötigten Sequenz in HIV-MA wurde das Membrantransportsignal des endogenen Retrovirus mIAP durch verschieden lange Anteile des N-terminalen HIV-MA ersetzt. Western Blot Analysen zeigten, daß es bei allen Konstrukten zu einer Freisetzung und Reifung viraler Partikel gekommen war. Die indirekte Immunfluoreszenz machte allerdings deutlich, daß die chimären Proteine vorrangig an zelluläre Membranen transportiert worden waren. Diese Experimente zeigen, daß im Rahmen chimärer HIV-IAP-Gag-Proteine N-terminale Bereiche von HIV-MA zur Freisetzung und Reifung des endogenen Retrovirus führen können. Zur Analyse der retroviralen Morphogenese durch Dimerisierung wurden zunächst die Bedingungen für den Ablauf der Dimerisierung mit Hilfe des GFP-Proteins festgelegt. Im Rahmen des Transports von HIV-Gag an die Plasmamembran konnte nach „Dimerizer“-Inkubation im Western Blot eine Zunahme der Freisetzung und Prozessierung viraler Gag-Polyproteine registriert werden. In der indirekten Immunfluoreszenz war eine deutliche Umverteilung von überwiegend zytoplasmatisch zu perinukleär zu beobachten. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten, daß es zur Bildung unreifer Partikel viralen Ursprungs gekommen war. Es fanden sich aber auch große heterogene vesikuläre Membranveränderungen mit hohen Konzentrationen an Src-FKBP(2), wodurch es nicht möglich war den genauen Zeitpunkt der Aktivierung der viralen Protease zu bestimmen. Die multiplen Membranveränderungen und die hohe Konzentration der Src-FKBP(2)-Proteine an der Plasmamembran, bildeten die Grundlage für weitere Experimente und neue Erkenntnisse: Die durch Zugabe des Dimerizers hervorgerufenen Interaktionen zwischen den membranständigen Src-FKBP-Proteinen sind offensichtlich in der Lage „Budding“-Strukturen aus vollständig nichtviralen Bestandteilen zu induzieren, was eine mögliche Grundlage für die Bildung von „Designerviren“ aus vollständig nichtviralen Bestandteilen sein könnte.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Amara, J.F., Clackson, T., Rivera, V.M., Guo, T., Keenan, T., Natesan, S., Pollock, R., Yang, W., Courage, N.L., Holt, D.A., and Gilman, M., *A versatile synthetic dimerizer for the regulation of protein-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10618-23.
2. Amara, J.F., Courage, N.L., and Gilman, M., *Cell surface tagging and a suicide mechanism in a single chimeric human protein*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(16): p. 2651-5.
3. Baltimore, D., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses*. Nature, 1970. **226**(252): p. 1209-11.
4. Barklis, E., McDermott, J., Wilkens, S., Fuller, S., and Thompson, D., *Organization of HIV-1 capsid proteins on a lipid monolayer*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7177-80.
5. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
6. Belshaw, P.J., Spencer, D.M., Crabtree, G.R., and Schreiber, S.L., *Controlling programmed cell death with a cyclophilin-cyclosporin-based chemical inducer of dimerization*. Chem Biol, 1996. **3**(9): p. 731-8.
7. Bennett, R.P., Nelle, T.D., and Wills, J.W., *Functional chimeras of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus gag proteins*. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6487-98.
8. Bess, J.W., Jr., Gorelick, R.J., Bosche, W.J., Henderson, L.E., and Arthur, L.O., *Microvesicles are a source of contaminating cellular proteins found in purified HIV-1 preparations*. Virology, 1997. **230**(1): p. 134-44.
9. Borsetti, A., Ohagen, A., and Gottlinger, H.G., *The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 9313-7.
10. Bowzard, J.B., Bennett, R.P., Krishna, N.K., Ernst, S.M., Rein, A., and Wills, J.W., *Importance of basic residues in the nucleocapsid sequence for retrovirus Gag assembly and complementation rescue*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 9034-44.
11. Bowzard, J.B., Bennett, R.P., Krishna, N.K., Ernst, S.M., Rein, A., and Wills, J.W., *Importance of basic residues in the nucleocapsid sequence for retrovirus Gag assembly and complementation rescue*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 9034-44.
12. Brody, B.A., Rhee, S.S., Sommerfelt, M.A., and Hunter, E., *A viral protease-mediated cleavage of the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus can be suppressed by mutations within the matrix protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3443-7.

13. Brody, B.A., Rhee, S.S., and Hunter, E., *Postassembly cleavage of a retroviral glycoprotein cytoplasmic domain removes a necessary incorporation signal and activates fusion activity*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4620-7.
14. Bryant, M. and Ratner, L., *Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(2): p. 523-7.
15. Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., and Kim, P.S., *Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein*. Cell, 1997. **89**(2): p. 263-73.
16. Chan, D.C. and Kim, P.S., *HIV entry and its inhibition*. Cell, 1998. **93**(5): p. 681-4.
17. Chen, C. and Okayama, H., *High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(8): p. 2745-52.
18. Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., Kuo, Y.H., Brookmeyer, R., Zeiger, M.A., Barditch-Crovo, P., and Siliciano, R.F., *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection*. Nature, 1997. **387**(6629): p. 183-8.
19. Chun, T.W., Justement, J.S., Moir, S., Hallahan, C.W., Ehler, L.A., Liu, S., McLaughlin, M., Dybul, M., Mican, J.M., and Fauci, A.S., *Suppression of HIV replication in the resting CD4+ T cell reservoir by autologous CD8+ T cells: implications for the development of therapeutic strategies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 253-8.
20. Cimorelli, A., Sandin, S., Hoglund, S., and Luban, J., *Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3046-57.
21. Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Salle, M., Montagnier, L., and Alizon, M., *Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2*. Nature, 1986. **324**(6098): p. 691-5.
22. Coffin, J., *Retroviridae: the viruses and their replication*, in Fields Virology, K.D. In: FieldsBN, Howley PM et al. (Hrsg.): Editor. 1996, Lippincott-Raven: Philadelphia (USA). p. (1767-1847).
23. Craven, R.C. and Parent, L.J., *Dynamic interactions of the Gag polyprotein*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **214**: p. 65-94.
24. Craven, R.C., Harty, R.N., Paragas, J., Palese, P., and Wills, J.W., *Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3359-65.
25. Dannull, J., Surovoy, A., Jung, G., and Moelling, K., *Specific binding of HIV-1 nucleocapsid protein to PSI RNA in vitro requires N-terminal zinc finger and flanking basic amino acid residues*. Embo J, 1994. **13**(7): p. 1525-33.
26. Deminie, C.A. and Emerman, M., *Functional exchange of an oncoretrovirus and a lentivirus matrix protein*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4442-9.

27. Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R., and Landau, N.R., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
28. Dietrich, U., Adamski, M., Kreutz, R., Seipp, A., Kuhnel, H., and Rubsamen-Waigmann, H., *A highly divergent HIV-2-related isolate*. Nature, 1989. **342**(6252): p. 948-50.
29. Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W.A., and Gottlinger, H.G., *Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein*. J Virol, 1994. **68**(3): p. 1689-96.
30. Dubay, J.W., Roberts, S.J., Hahn, B.H., and Hunter, E., *Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity*. J Virol, 1992. **66**(11): p. 6616-25.
31. Durack, D.T., *Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1465-7.
32. Facke, M., Janetzko, A., Shoeman, R.L., and Krausslich, H.G., *A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4972-80.
33. Fehrmann, F., Welker, R., and Krausslich, H.G., *Intracisternal A-type particles express their proteinase in a separate reading frame by translational frameshifting, similar to D-type retroviruses*. Virology, 1997. **235**(2): p. 352-9.
34. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
35. Freed, E.O., Orenstein, J.M., Buckler-White, A.J., and Martin, M.A., *Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5311-20.
36. Freed, E.O. and Martin, M.A., *Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1984-9.
37. Freed, E.O., *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle*. Virology, 1998. **251**(1): p. 1-15.
38. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M., and Hahn, B.H., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
39. Garnier, L., Ratner, L., Rovinski, B., Cao, S.X., and Wills, J.W., *Particle size determinants in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 4667-77.

40. Garnier, L., Parent, L.J., Rovinski, B., Cao, S.X., and Wills, J.W., *Identification of retroviral late domains as determinants of particle size*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2309-20.
41. Garoff, H., Hewson, R., and Opstelten, D.J., *Virus maturation by budding*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1171-90.
42. Gelderblom, H.R., Ozel, M., and Pauli, G., *Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations*. Arch Virol, 1989. **106**(1-2): p. 1-13.
43. Gelderblom, H.R., *Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function*. Aids, 1991. **5**(6): p. 617-37.
44. Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., and De Wilde, M., *Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells*. Cell, 1989. **59**(1): p. 103-12.
45. Gluschankof, P., Mondor, I., Gelderblom, H.R., and Sattentau, Q.J., *Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations*. Virology, 1997. **230**(1): p. 125-33.
46. Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1425-31.
47. Gottlinger, H.G., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A., *Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5781-5.
48. Gottlinger, H.G., Dorfman, T., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A., *Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3195-9.
49. Granowitz, C. and Goff, S.P., *Substitution mutations affecting a small region of the Moloney murine leukemia virus MA gag protein block assembly and release of virion particles*. Virology, 1994. **205**(1): p. 336-44.
50. Gross, I., Hohenberg, H., and Krausslich, H.G., *In vitro assembly properties of purified bacterially expressed capsid proteins of human immunodeficiency virus*. Eur J Biochem, 1997. **249**(2): p. 592-600.
51. Gross, I., Hohenberg, H., Huckhagel, C., and Krausslich, H.G., *N-Terminal extension of human immunodeficiency virus capsid protein converts the in vitro assembly phenotype from tubular to spherical particles*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 4798-810.
52. Heim, R. and Tsien, R.Y., *Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer*. Curr Biol, 1996. **6**(2): p. 178-82.
53. Hill, C.P., Worthylake, D., Bancroft, D.P., Christensen, A.M., and Sundquist, W.I., *Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein*:

*implications for membrane association and assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 3099-104.

54. Huang, M., Orenstein, J.M., Martin, M.A., and Freed, E.O., *p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease*. J Virol, 1995. **69**(11): p. 6810-8.

55. Huse, M., Chen, Y.G., Massague, J., and Kuriyan, J., *Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12*. Cell, 1999. **96**(3): p. 425-36.

56. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H., *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene, 1990. **96**(1): p. 23-8.

57. Jorgensen, E.C., Pedersen, F.S., and Jorgensen, P., *Matrix protein of Akv murine leukemia virus: genetic mapping of regions essential for particle formation*. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4479-87.

58. Kimpton, J. and Emerman, M., *Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene*. J Virol, 1992. **66**(4): p. 2232-9.

59. Krausslich, H.G., Facke, M., Heuser, A.M., Konvalinka, J., and Zentgraf, H., *The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3407-19.

60. Krausslich, H.G. and Welker, R., *Intracellular transport of retroviral capsid components*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **214**: p. 25-63.

61. Kuff, E.L. and Lueders, K.K., *The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects*. Adv Cancer Res, 1988. **51**: p. 183-276.

62. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.

63. Lee, P.P. and Linial, M.L., *Efficient particle formation can occur if the matrix domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag is substituted by a myristylation signal*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6644-54.

64. Mammano, F., Kondo, E., Sodroski, J., Bukovsky, A., and Gottlinger, H.G., *Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3824-30.

65. Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato, I., Stouwe, R.A., Holzman, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W., and Cunningham-Rundles, S., *An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1431-8.

66. Maurer, B. and Flugel, R.M., *Genomic organization of the human spumaretrovirus and its relatedness to AIDS and other retroviruses*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1988. **4**(6): p. 467-73.

67. Montagnier, L., Chermann, J.C., Barre-Sinoussi, F., Klatzmann, D., Wain-Hobson, S., Alizon, M., Clavel, F., Brun-Vezinet, F., Vilmer, E., Rouzioux, C., and et al., *Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS*. Princess Takamatsu Symp, 1984. **15**: p. 319-31.
68. Nermut, M.V. and Hockley, D.J., *Comparative morphology and structural classification of retroviruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **214**: p. 1-24.
69. Okadome, T., Oeda, E., Saitoh, M., Ichijo, H., Moses, H.L., Miyazono, K., and Kawabata, M., *Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor-beta type I receptor in vivo*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21687-90.
70. Ono, A., Orenstein, J.M., and Freed, E.O., *Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type I assembly*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2855-66.
71. Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M., *Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes*. J Cell Biol, 1985. **101**(3): p. 942-8.
72. Parent, L.J., Bennett, R.P., Craven, R.C., Nelle, T.D., Krishna, N.K., Bowzard, J.B., Wilson, C.B., Puffer, B.A., Montelaro, R.C., and Wills, J.W., *Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5455-60.
73. Patnaik, A., Chau, V., and Wills, J.W., *Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13069-74.
74. Pepinsky, R.B. and Vogt, V.M., *Identification of retrovirus matrix proteins by lipid-protein cross-linking*. J Mol Biol, 1979. **131**(4): p. 819-37.
75. Prasher, D.C., *Using GFP to see the light*. Trends Genet, 1995. **11**(8): p. 320-3.
76. Puffer, B.A., Parent, L.J., Wills, J.W., and Montelaro, R.C., *Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6541-6.
77. Reil, H., Bukovsky, A.A., Gelderblom, H.R., and Gottlinger, H.G., *Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein*. Embo J, 1998. **17**(9): p. 2699-708.
78. Rhee, S.S. and Hunter, E., *Myristylation is required for intracellular transport but not for assembly of D-type retrovirus capsids*. J Virol, 1987. **61**(4): p. 1045-53.
79. Rhee, S.S. and Hunter, E., *A single amino acid substitution within the matrix protein of a type D retrovirus converts its morphogenesis to that of a type C retrovirus*. Cell, 1990. **63**(1): p. 77-86.
80. Rhee, S.S. and Hunter, E., *Structural role of the matrix protein of type D retroviruses in gag polyprotein stability and capsid assembly*. J Virol, 1990. **64**(9): p. 4383-9.

81. Rhee, S.S. and Hunter, E., *Amino acid substitutions within the matrix protein of type D retroviruses affect assembly, transport and membrane association of a capsid*. *Embo J*, 1991. **10**(3): p. 535-46.
82. Sambrook, F.E., Maniatis T, *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
83. Schmalzbauer, E., Strack, B., Dannull, J., Guehmann, S., and Moelling, K., *Mutations of basic amino acids of NCp7 of human immunodeficiency virus type 1 affect RNA binding in vitro*. *J Virol*, 1996. **70**(2): p. 771-7.
84. Schubert, U., Ott, D.E., Chertova, E.N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M.F., Bennink, J.R., Krausslich, H.G., and Yewdell, J.W., *Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(24): p. 13057-62.
85. Schultz, A.M. and Oroszlan, S., *In vivo modification of retroviral gag gene-encoded polyproteins by myristic acid*. *J Virol*, 1983. **46**(2): p. 355-61.
86. Spencer, D.M., Wandless, T.J., Schreiber, S.L., and Crabtree, G.R., *Controlling signal transduction with synthetic ligands*. *Science*, 1993. **262**(5136): p. 1019-24.
87. Stockwell, B.R. and Schreiber, S.L., *TGF-beta-signaling with small molecule FKBP12 antagonists that bind myristoylated FKBP12-TGF-beta type I receptor fusion proteins*. *Chem Biol*, 1998. **5**(7): p. 385-95.
88. Temin, H.M. and Mizutani, S., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. *Nature*, 1970. **226**(252): p. 1211-3.
89. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. 1979. *Biotechnology*, 1992. **24**: p. 145-9.
90. Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.J., and Moore, J.P., *CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5*. *Nature*, 1996. **384**(6605): p. 184-7.
91. Ullrich, A. and Schlessinger, J., *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. *Cell*, 1990. **61**(2): p. 203-12.
92. Wang, C.T., Lai, H.Y., and Li, J.J., *Analysis of minimal human immunodeficiency virus type 1 gag coding sequences capable of virus-like particle assembly and release*. *J Virol*, 1998. **72**(10): p. 7950-9.
93. Weaver, T.A. and Panganiban, A.T., *N myristoylation of the spleen necrosis virus matrix protein is required for correct association of the Gag polyprotein with intracellular membranes and for particle formation*. *J Virol*, 1990. **64**(8): p. 3995-4001.
94. Welker, R., Janetzko, A., and Krausslich, H.G., *Plasma membrane targeting of chimeric intracisternal A-type particle polyproteins leads to particle release and specific activation of the viral proteinase*. *J Virol*, 1997. **71**(7): p. 5209-17.

95. Welker, R., *Dissertation: Bedeutung des Nef Proteins für die Infektiosität des Humanen Immundefizienzvirus (HIV)*, in *Deutsches Krebsforschungszentrum*. 1997, Ruprecht-Karls-Universität: Heidelberg.
96. Weng, Y. and Weiss, C.D., *Mutational analysis of residues in the coiled-coil domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41*. *J Virol*, 1998. **72**(12): p. 9676-82.
97. Wiegers, K., Rutter, G., Kottler, H., Tessmer, U., Hohenberg, H., and Krausslich, H.G., *Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites*. *J Virol*, 1998. **72**(4): p. 2846-54.
98. Wilk, T., Pfeiffer, T., and Bosch, V., *Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product*. *Virology*, 1992. **189**(1): p. 167-77.
99. Wills, J.W., Craven, R.C., and Achacoso, J.A., *Creation and expression of myristylated forms of Rous sarcoma virus gag protein in mammalian cells*. *J Virol*, 1989. **63**(10): p. 4331-43.
100. Wills, J.W., Craven, R.C., Weldon, R.A., Jr., Nelle, T.D., and Erdie, C.R., *Suppression of retroviral MA deletions by the amino-terminal membrane-binding domain of p60src*. *J Virol*, 1991. **65**(7): p. 3804-12.
101. Wills, J.W. and Craven, R.C., *Form, function, and use of retroviral gag proteins*. *Aids*, 1991. **5**(6): p. 639-54.
102. WN, K., *Textbook of Internal Medicine*. 3. Auflage ed. 1997, Philadelphia: Lippincott-Raven.
103. Wodrich, H., *Dissertation: Untersuchungen zur post-transkriptionellen Regulation der Genexpression*, in *Heinrich-Pette-Institut*. 1998, Universität Hamburg: Hamburg.
104. Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T.H., and Essex, M., *The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions*. *J Virol*, 1992. **66**(8): p. 4966-71.
105. Yuan, X., Yu, X., Lee, T.H., and Essex, M., *Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor*. *J Virol*, 1993. **67**(11): p. 6387-94.
106. Zhou, W., Parent, L.J., Wills, J.W., and Resh, M.D., *Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids*. *J Virol*, 1994. **68**(4): p. 2556-69.
107. Zhou, W. and Resh, M.D., *Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein*. *J Virol*, 1996. **70**(12): p. 8540-8.

## **7. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-G. Käusslich für die Überlassung des interessanten Themas, seine sehr gute wissenschaftliche Betreuung und sein kontinuierliches Interesse an dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Reinhold Welker für die ausgezeichnete Betreuung, seine Geduld und Diskussionsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Gabriel Rutter danke ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Analysen und die vielen interessanten Diskussionen und Anregungen.

Bei Bettina Cardel bedanke ich mich für die lustige und gute Zusammenarbeit und ihre Hilfe bei vielen Klonierungsarbeiten.

Allen Mitarbeitern der Abteilung für Zellbiologie und Virologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

## **8. Lebenslauf**

### **Allgemeine Daten**

Name: Streckenbach, Karen Erika Martha  
 Geburtstag: 28.07.1972  
 Geburtsort: Greifswald  
 Religion: evangelisch  
 Familienstand: ledig  
 Eltern: Dr. Karla Streckenbach, Ärztin  
 Dr. med. habil. Bernd Streckenbach, Arzt

### **Schulbildung**

1978 – 82 Grundschule Ernst-Moritz-Arndt, Greifswald  
 1982 – 86 Gesamtschule Grete-Walter, Greifswald  
 1986 – 87 Gymnasium Friedrich-Ludwig-Jahn, Greifswald  
 1987 aus politischen Gründen vom Gymnasium verwiesen  
 1987 – 88 Gesamtschule Grete-Walter, Greifswald, Mittlere Reife  
  
 1988 – 89 Schulbesuch aus politischen Gründen verboten  
 06/1989 Übersiedlung aus der DDR in die Bundesrepublik Deutschland  
  
 1989 – 90 Humanistisches Gymnasium, Aschaffenburg/Bayern  
 1990 – 91 Mayville High School, Michigan, USA, Graduation  
 1991 – 93 Gymnasium Sophie-Barat, Hamburg, Abitur  
  
 09-12/1993 Tätigkeit als Deutschlehrerin an der "Peterschule" in St. Petersburg, Russland

### **Akademischer Werdegang**

10/1993 Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Hamburg  
 03/1996 Ärztliche Vorprüfung  
 03/1997 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 03/2000 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 04/2001 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit 07/2001 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie des  
Universitätsklinikums Hamburg

Veröffentlichungen:

Poster - Gesellschaft für Virologie, Jahrestagung Wien 2000

Thema: "Small molecule induced conditional budding of enveloped virus-like partikels from  
mammalian cells" (Auszeichnung mit 2. Preis)

## **9. Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.