

Freie Universität Berlin

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

Robert Koch-Institut

Fachgebiet 18: HIV und andere Retroviren

Bachelorarbeit

Nachweis der Interaktion zwischen Staufen-1 und den retroviralen Proteinen Rev und Rec mittels FRET-Assays

vorgelegt von: Angelina Bloch

Studiengang: Monobachelor Biologie (StOPO 2012)

Berlin, 6. Juni 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Retroviren	1
1.2. HIV	2
1.2.1 Genomstruktur, Proteine und Struktur von HIV-1	2
1.2.2 Rev.....	4
1.3. SIV	4
1.4. HERV-K	5
1.4.1. Rec.....	5
1.5. Stufen-1	5
1.6. Förster/Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET).....	6
1.7. Zielstellung	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Material	9
2.1.1. Geräte und Software.....	9
2.1.2. Chemikalien.....	9
2.1.3. Reagenzien	10
2.1.4. DNA- und Proteinmarker.....	10
2.1.5. Enzyme	10
2.1.6. Verbrauchsmaterialien/kommerzielle Kits	11
2.1.7. Antibiotika	11
2.1.8. Nährmedien	11
2.1.9. Stammlösungen.....	12
2.1.10. Organismen.....	13
2.1.11. Antikörper	13
2.1.11.1. Primäre Antikörper	13
2.1.11.2. Sekundäre Antikörper	14
2.1.12. Primer.....	14
2.1.13. Vektoren	14
2.2. Methoden	15
2.2.1. Kultivierung und Stammhaltung von Organismen	15
2.2.1.1. E.coli.....	15

2.2.1.2.	Humane Zelllinien	15
2.2.1.3.	Bestimmung der Zellzahl von humanen Zellen	15
2.2.2.	Arbeiten mit DNA.....	16
2.2.2.1.	Plasmidisolierung aus E.coli	16
2.2.2.2.	DNA -Konzentrationsbestimmung.....	16
2.2.2.3.	PCR.....	16
2.2.2.4.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	17
2.2.2.5.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	17
2.2.2.6.	Restriktionsverdau	18
2.2.2.7.	Ligation.....	18
2.2.2.8.	Transformation	18
2.2.2.9.	Sequenzierung von DNA-Molekülen	19
2.2.2.10.	Klonierung	19
2.2.3.	Arbeiten mit Proteinen	20
2.2.3.1.	Transfektion.....	20
2.2.3.1.1.	Transfektion mittels Transfektionsreagenz.....	20
2.2.3.1.2.	Transfektion mit Calciumphosphat	20
2.2.3.2.	Probenvorbereitung zum Nachweis spezifischer Proteine.....	20
2.2.3.3.	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	21
2.2.3.4.	Western-Blot-Analyse	21
2.2.3.5.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und FRET-Analyse	22
2.2.3.6.	<i>Proximity ligation assay (PLA)</i>	23
2.2.4.	Berechnung der Standardabweichung.....	24
2.2.5.	Berechnung des Signifikanzwerts (<i>p-value</i>)	24
3.	Ergebnisse	25
3.1.	Nachweis der Proteinexpression der Akzeptor- und Donor- Fluoreszenzproteine ..	25
3.1.1.	Nachweis der Proteinexpression der Akzeptor- und Donor- Fluoreszenzproteine mittels Western Blot-Analyse	25
3.1.1.1.	Untersuchung der DNA-Konzentrationen der Konstrukte	26
3.1.1.2.	Untersuchung der Proteinexpression von HIV-1-Rev-CFP	27
3.1.2.	Nachweis der Proteinexpression der Akzeptor- und Donor- Fluoreszenzproteine mittels cLSM	28
3.1.2.1.	Analyse der Granula- bzw. Kernkörperchenformation	29
3.2.	FRET-Interaktionsanalyse	29
3.2.1.	Interaktionsanalyse mit der Staufen- Δ RBD4,5-Mutante	31
3.2.1.1.	Kolokalisationsanalyse der Staufen-1- Δ RBD4,5-Mutante mit den Rev/Rec-Konstrukten.....	32

3.3. Interaktionsanalyse mittels PLA-Analyse.....	33
4. Diskussion.....	35
4.1. Analyse der PPI von HIV-1-Rev, SIV-Rev und HERVK-Rec mit Staufen-1 mittels FRET-Analyse	35
4.2. Analyse der PPI von HIV-1-Rev, SIV-Rev und HERVK-Rec mit Staufen-1 mittels PLA-Analyse.....	36
4.3. Analyse der PPI von HIV-1-Rev, SIV-Rev und HERVK-Rec mit Staufen-1- Δ RBD4,5- Verkürzungsmutante mittels FRET-Analyse.....	37
5. Zusammenfassung.....	38
Anhang.....	39
Literaturverzeichnis	42
Danksagung.....	49
Selbstständigkeitserklärung.....	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema eines typischen Retrovirusgenoms.....	1
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des HIV-1-Genoms	3
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Virions von HIV-1	3
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Methode des Akzeptor-Photobleichens.....	7
Abbildung 5:	Western Blot-Analyse zum Nachweis der Expression von Akzeptor- (A) und Donor- Fluoreszenzproteinen (B) in HEK293T-Zellen	25
Abbildung 6:	Western Blot-Analyse zum Nachweis der Expression von Akzeptor- (A) und Donor- Fluoreszenzproteinen (B) in HeLa-Zellen	26
Abbildung 7:	Agarose-Gelelektrophorese zur Untersuchung der DNA-Konzentrationen der verschiedenen Konstrukte	27
Abbildung 8:	Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Proteinexpression mit unterschiedlicher Plasmid-DNA-Konzentration von pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1.	27
Abbildung 9:	Konfokalmikroskopische Aufnahmen transfizierter Zellen mit FRET-Vektoren.....	28
Abbildung 10:	Ergebnisse der Akzeptor-Photobleichung- Experimente mit HeLa-Zellen	30
Abbildung 11:	Ergebnisse der FRET-Effizienzbestimmung.....	31
Abbildung 12:	Ergebnisse der Akzeptor-Photobleichung-Experimente mit der Staufen-1-Verkürzungsmutante 2	32
Abbildung 13:	Ergebnisse der Kollokalisationsanalyse der Staufen-1-Verkürzungsmutante 2 mit den Rev/Rec-Konstrukten.....	33
Abbildung 14:	Ergebnisse der PLA-Analyse	34
Abbildung 15:	Ergebnisse der Akzeptor-Photobleichung- Experimente mit HEK293T-Zellen	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Taxonomie der Retroviren.....	1
Tabelle 2:	PCR-Bedingungen.....	17
Tabelle 3:	PCR-Bedingungen bei der Sequenzierung von DNA-Molekülen.....	19
Tabelle 4:	Verwendete Primer zur Generierung der Staufen-Verkürzungsmutanten.....	20
Tabelle 5:	Verwendete Anregungswellenlängen und Emissionswellenlängen.....	22
Tabelle 6:	Transfektionsschema zur Ermittlung der FRET-Effizienzen	23
Tabelle 7:	Ergebnisse der Granula/Kernkörperchen-Auszählung	29
Tabelle 8:	Rohdaten der FRET-Effizienzbestimmung	40
Tabelle 9:	Signifikanzwerte der FRET-Effizienzbestimmung	40
Tabelle 10:	Rohdaten der PLA-Analyse.....	40
Tabelle 11:	Signifikanzwerte der PLA-Analyse.....	41

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>bleed-through/ cross-talk</i>	spektrales Durchbluten
CA	Kapsidprotein
CFP	blau fluoreszierendes Protein (engl. <i>cyan fluorescent protein</i>)
cLSM	konfokale Laser-Mikroskopie (engl. <i>confocal laser scanning microscopy</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>env</i>	<i>envelope</i>
ERV	endogener Retrovirus
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FKS	fötales Kälberserum
FLIM	<i>fluorescence life time imaging</i>
FRET	Fluoreszenz (Förster)- Resonanz-Energie-Transfer
<i>gag</i>	<i>group specific antigen</i>
HEK293T	<i>human embryonic kidney 293T</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HERV-K	humanes endogenes Retrovirus K (engl. <i>human endogenous retrovirus K</i>)
HIV	humanes Immundefizienz-Virus (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
IN	Integrase
LB	<i>lysogeny borth</i>
LTRs	Wiederholungssequenzen (engl. <i>Long Terminal Repeats</i>)
MA	Matrixprotein
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nukleokapsidprotein
Nef	<i>negative factor</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>

NLS	<i>nuclear localization signal</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PLA	<i>proximity ligation assay</i>
<i>pol</i>	<i>polymerase</i>
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PR	Protease
<i>pro</i>	Protease
<i>p-value</i>	Signifikanzwert (p = probability)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RcRE	<i>Rec-responsive element</i>
Rev	<i>regulator of virion protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>regions of interest</i>
RT	Reverse Transkriptase
RvRE	<i>Rev-responsive element</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIV	simianes Immundefizienz-Virus (engl. <i>simian immunodeficiency virus</i>)
snRNP	<i>small nuclear ribonucleo protein</i>
SU	surface
TAR-Element	<i>trans-activating response element</i>
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TB	<i>terrific broth</i>
TBD	Tubulin-Bindedomäne (engl. <i>tubulin binding domain</i>)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	<i>transmembrane</i>
Vif	<i>viral infectivity factor</i>
Vpr	<i>viral protein rapid</i>
Vpu	<i>viral protein out</i>
XRV	exogener Retrovirus
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (engl. <i>yellow fluorescent protein</i>)

1. Einleitung

1.1. Retroviren

Retroviren (Reverse Transkriptase Onkoviren) sind etwa 100 nm große, behüllte Viren, die ein 7-12 kb (Kilobasen) großes, einsträngig-plusorientiertes-RNA (Ribonukleinsäure)-Genom besitzen (Susanne Modrow: *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2010, Seite 19). Anders als bei allen anderen RNA-Viren ist das Genom der Retroviren diploid angelegt und kann nicht ohne weiteres als Matrize (mRNA) genutzt werden. Es muss für die Integration in das Wirtsgenom mittels reverser Transkription in doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (dsDNA) umgeschrieben werden. Hierfür bringt das Virus das 1970 entdeckte Enzym reverse Transkriptase mit, das eine RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität besitzt (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970). Außerdem besitzt das Virus das Enzym Integrase, welches für die Integration in das Wirtsgenom zuständig ist. Daher weicht der Replikationszyklus eines Retrovirus von dem anderer Viren ab. Der Replikationszyklus besteht aus Infektion der Zelle, reverser Transkription, Überwindung der Kernhülle, Integration in das Wirtsgenom, Expression der viralen Proteine und des RNA-Genoms und Bildung neuer Viruspartikel. Die Virusfamilie der Retroviren (*Retroviridae*) wird durch die aktuelle und zurzeit verbindliche Taxonomie des *International Committee on Taxonomy of Viruses* in zwei Unterfamilien mit insgesamt sieben Gattungen unterteilt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Taxonomie der Retroviren

Unterfamilie	Gattung	Beispiel
Orthoretroviren (<i>Orthoretrovirinae</i>)	Alpharetrovirus	Aviäre Leukosevirus, Rous-Sarkom-Virus
	Betaretrovirus	Jaagsiekte Schaf-Retrovirus, human endogener Retrovirus K (Weiss, 2006)
	Gammaretrovirus	Murine Leukämievirus, Feline Leukämievirus
	Deltaretrovirus	Bovine Leukämie-Virus, humane T-lymphotrope Virus 1-3
	Epsilonretrovirus	Glasaugenbarsch dermale Sarkom-Virus, Glasaugenbarsch Epidermishyperplasie Virus
	Lentivirus	Human Immundefizienz-Virus 1 und 2, Simian Immundefizienz-Virus
Spumaretroviren (<i>Spumaretrovirinae</i>)	Spumavirus	Simian Foamy-Virus, Feline Foamy-Virus

Zusätzlich können Retroviren auch in endogene und exogene Retroviren unterteilt werden. Hierbei gelten Retroviren, die im Genom von Keimbahnen und in somatischen Zellen vorkommen als endogene Retroviren (ERV) und Retroviren, die nur in somatischen Zellen verankert sind als exogene Retroviren (XRV). Das Genom eines einfachen Retrovirus besteht aus drei Genen (*gag*, *pol*, *env*) und zwei Wiederholungssequenzen (*Long Terminal Repeats*, LTRs), die sich am Anfang und am Ende des Genoms befinden (Susanne Modrow: *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2010, Kapitel 18) (Abbildung 1).



Abbildung 1: Schema eines typischen Retrovirusgenoms. Die Hauptbestandteile des Genoms sind die Gene *gag*, *pol* und *env*. Am 5'- und 3'-Ende befinden sich *Long Terminal Repeats* (LTRs). Zusätzlich befindet sich am 5'-Ende ein Signal zum Verpacken der RNA (Ψ).

Die LTRs enthalten Informationen zur Steuerung der Expression der viralen Gene. Gag (*group specific antigen*) codiert die Matrix- (MA), Kapsid- (CA) und Nukleokapsidproteine (NC) und das Linkerprotein p6. Die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) werden von dem *pol* (*polymerase*)- Gen codiert. Für das Oberflächenprotein SU (*surface*) und das Hüllprotein TM (*transmembrane*) codiert *env* (*envelope*). SU ist für die Erkennung der wirtsspezifischen Rezeptoren wichtig und TM vermittelt die Fusion mit der Wirtsmembran. Zusätzlich befindet sich im 5'-Bereich von regulatorischen Sequenzen des Retrovirusgenoms eine mit Ψ bezeichnete Sequenz, die ein Signal für das Verpacken der RNA ist, eine Primerbindungsstelle und ein Promotor. Bei einigen Retroviren unterscheidet sich der Aufbau des Genoms von diesem generellen Aufbau, z.B. hat die Protease bei Beta- und Deltaretroviren ein eigenes Leseraster (*pro*) und komplexe Retroviren wie z.B. das humane Immundefizienz-Virus (HIV) besitzen noch weitere regulatorische Gene (sog. akzessorische Gene).

1.2. HIV

HIV wurde erstmals 1982 von einer französischen Arbeitsgruppe um Luc Montagnier isoliert und beschrieben (Barre-Sinoussi et al., 1983). Dort wurde es noch als humanes T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV) bezeichnet. 1986 erhielt es dann vom *International Committee on Taxonomy of Viruses* die Bezeichnung HIV-1. Noch im selben Jahr wurde ein zweiter HIV-Typ bei einem afrikanischen Patienten entdeckt, welche die Bezeichnung HIV-2 bekam (Clavel et al., 1986). HIV-2 ist jedoch nicht so weit verbreitet wie HIV-1. Der Ursprung von HIV liegt in mehreren unabhängigen Übertragungen vom simianen Immundefizienz-Virus (SIV) auf den Menschen. Wobei HIV-1 von dem in Schimpansen vorherrschenden SIV-Typ SIVcpz und HIV-2 von dem in Rußmangaben vorkommenden SIV-Typ SIVsm abstammt (Hahn et al., 2000). Die beiden HIV-Formen weisen höhere Homologien zu ihren ursprünglichen SIV-Formen auf als zueinander. Untereinander besteht nur eine ca. 40%ige Homologie in der RNA-Sequenz (Chakrabarti et al., 1987; Guyader et al., 1987). Eine HIV-Infektion ist die Ursache für das erworbene Immundefektsyndrom (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS). An dem laut UNAIDS, dem Aidsprogramm der Vereinten Nationen, 2014 weltweit 1,2 Millionen Menschen starben.

1.2.1 Genomstruktur, Proteine und Struktur von HIV-1

Das HIV-Genom ist ca. 9 kb lang, besitzt neun offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) und codiert für 15 Proteine (Abbildung 2) (Frankel and Young, 1998). Die Strukturproteine MA, CA, NC, p6, SU und TM, sowie die viralen Enzyme PR, RT und IN sind in HIV-1, sowie in allen anderen Retroviren, vorzufinden. HIV zeichnet sich besonders durch das Vorhandensein der zusätzlichen regulatorischen Proteine Tat (*transactivator of transcription*) und Rev (*regulator of virion proteins*) und den akzessorischen Proteinen Nef (*negative factor*), Vif (*viral infectivity factor*), Vpu (*viral protein out*) und Vpr (*viral protein rapid*) aus, welche bei anderen Retroviren nicht vorzufinden sind. Tat ist ein Transkriptionsverstärker, der durch Bindung an das TAR-Element (*trans-activating response element*) aktiviert wird (Aboul-ela et al., 1995).

Rev ist ein RNA-Transport-Protein, welches besonders ungespleißte RNAs vom Nukleus ins Cytoplasma transportiert (Fischer et al., 1994). Nef erhöht die Replikationsrate von HIV (Lama et al., 1999) und ist zuständig für die Reduktion von CD4 auf der Zelloberfläche, damit eine Superinfektion der Zelle vermieden wird (Benson et al., 1993), denn HIV infiziert alle Zellen, die den Oberflächenrezeptor CD4 aufweisen. Vif ist wichtig für die Produktion der reifen Virionen. Vif Mutanten zeigen weniger virale DNA Synthese, produzieren instabile Replikationsprodukte und sind dadurch weniger infektiös. Dies lässt vermuten, dass Vif vor oder während der DNA-Synthese eine wichtige Rolle spielt (Frankel and Young, 1998). Vpu unterstützt die Zusammensetzung der neuen Virionen, indem es bei der Degradation von CD4-Molekülen im endoplasmatischen Retikulum hilft (Willey et al., 1992). Dies ist wichtig, damit SU und TM nicht vorzeitig an den Rezeptor binden. Vpr ist notwendig nach dem *uncoating*-Prozess beim Transport des Nukleoprotein-Komplexes zum Nukleus des Wirtes (Frankel and Young, 1998).

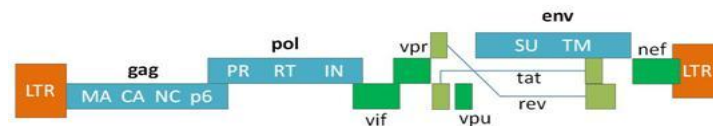


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HIV-1-Genoms. Das HIV-1-Genom besitzt neun offene Leseraster und codiert für 15 Proteine. Abbildung nach Frankel und Young, 1998 erstellt.

Das Kapsid von HIV weist eine konische Form auf und wird aus ca. 2000 Molekülen CA-Protein gebildet (Ganser et al., 1999). In dem Kapsid befinden sich die zwei identischen RNA-Moleküle umgeben von Nukleokapsidproteinen (NC) und die Proteine p6, PR, RT, IN, vif, vpr, nef (Abbildung 3). Es ist von einem Ring aus MA-Protein umgeben. Die MA sind N-terminal durch Myristoylierung mit einer Lipid-Doppelschicht assoziiert (Gelderblom, 1991). Die Lipid-Doppelschicht wird aus der Membran der Wirtszelle gebildet. In die Membran ist das transmembrane Hüllprotein TM eingelagert, welches mit SU nicht kovalent assoziiert ist.

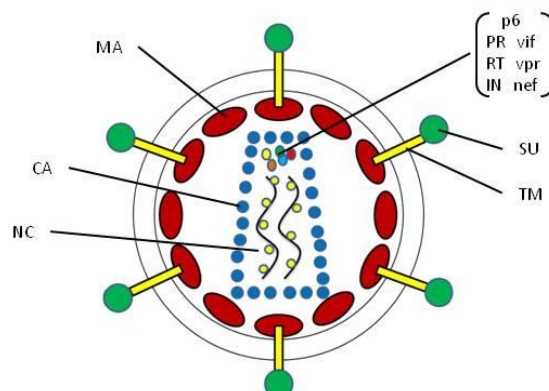


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Virions von HIV-1. Die zwei identischen RNA-Moleküle sind von Nukleokapsidproteinen umgeben und liegen zusammen mit den Proteinen p6, PR, RT, IN, vif, vpr, nef im konisch geformten Kapsid. Das Kapsid ist von einem Ring aus Matrixproteinen umgeben. Die Matrixproteine sind mit der Lipid-Doppelschicht assoziiert, in die das transmembrane Hüllprotein TM eingelagert ist. TM ist wiederum mit dem Oberflächenprotein SU assoziiert. Abbildung nach Frankel und Young, 1998 erstellt.

1.2.2 Rev

In Säugetierzellen ist der nukleäre Transport von Intron-beinhaltenen Transkripten beschränkt. Um diese Beschränkung zu überwinden, hat sich in HIV-1 das 13 kDA große RNA-Transport Protein Rev evolviert (Coffin JM, 1997). Rev besitzt ein *nuclear localization signal* (NLS), welches ihm erlaubt aus dem Cytoplasma in den Nukleus und vom Nukleus in das Cytoplasma zu wandern und ein *nuclear export signal* (NES) (Frankel and Young, 1998; Hope, 1999). Über das NES bindet Rev an das *Rev-responsive element* (RvRE), welches im *env*-Gen lokalisiert ist (Malim et al., 1989b; Malim et al., 1990; Pollard and Malim, 1998). Durch die Bindung von Rev mit dem RvRE wird die mRNA vom Nukleus ins Cytoplasma transportiert (Fischer et al., 1994). Darüber hinaus ist Rev besonders in der späten Infektionsphase wichtig, da es die cytoplasmatische Expression der späten HIV-1 mRNAs, die unter anderem für die Strukturproteine von *gag* und *env* codieren, induziert (Cullen, 1991; Malim et al., 1989b). Auch hierbei spielt das RvRE eine wichtige Rolle, da Rev ohne das RvRE die cytoplasmatische Expression der ungespleißten RNAs nicht regulieren kann (Malim et al., 1989b). Des Weiteren kann Rev während der späten Phase der Spleißosomfertigung durch Zufuhr zusätzlicher snRNPs (*small nuclear ribonucleo proteins*) das Spleißen direkt hemmen (Kjems and Sharp, 1993). Alles in allem lässt sich sagen, dass Rev ein wichtiger und unentbehrlicher Faktor für HIV-1 ist, denn ohne Rev ist die Replikation des Virus nicht möglich (Ishaq et al., 2008; Thomas et al., 1998; Yedavalli et al., 2004).

1.3. SIV

Da SIV der Vorläufer von HIV ist, sind die Morphologie und Genomorganisation vergleichbar (Desrosiers et al., 1989). Beispielsweise hat SIVmac eine 75%ige Nukleotidsequenzhomologie zu HIV-2 (Chakrabarti et al., 1987). SIV besitzt genau wie HIV die zusätzlichen regulatorischen Proteine Tat und Rev und die akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpu und Vpr und infiziert Zellen mit dem Oberflächenprotein CD4 (Desrosiers, 1988; Desrosiers et al., 1989). Wie bei HIV ist auch bei SIV das Protein Rev für den Transport einfacher und ungespleißter Transkripte vom Nukleus zum Cytoplasma zuständig und induziert auch hier die Expression der ungespleißten Transkripte, die für die Strukturproteine codieren (Malim et al., 1989a). Es gibt aber auch Unterschiede zwischen SIV und HIV. So besitzt SIV beispielsweise ein vorzeitiges Translationsterminierungssignal im *env*-Gen, was zu einer verkürzten Form von des Transmembranproteins führt, und einen zusätzlichen ORF, welcher in HIV-1 nicht vorzufinden ist (Desrosiers, 1988). Des Weiteren gibt es anders als bei HIV von SIV nicht nur zwei Subtypen, sondern viele verschiedene SIV-Stämme, die für je eine Affenspezies spezifisch sind. So stammt z.B. das 1985 entdeckte SIVmac aus infizierten Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), SIVagm aus der Grünmeerkatze (engl. *African green monkey*) und SIVrcm aus Rotkopfmangabenen (engl. *Redcapped magabey*) (Klatt et al., 2012). Der größte Unterschied zwischen HIV und SIV ist, dass SIV in der Regel keine Symptome verursacht, solange es Affen der für den SIV-Stamm spezifischen Affenspezies befällt (Desrosiers et al., 1989; Klatt et al., 2012; Pandrea and Apetrei, 2010). Jedoch lösen die meisten SIV-Stämme in Rhesusaffen AIDS-ähnliche Symptome hervor (Desrosiers, 1988). Daher werden Rhesusaffen häufig in der AIDS-Forschung verwendet (Kestler et al., 1990).

1.4. HERV-K

Der human endogene Retrovirus K (HERV-K) zählt zu den endogenen Retroviren und kam vermutlich durch Infektionen von Keimzellen mit exogenen Viren zustande, die sich dann in der Bevölkerung etabliert haben (Langner et al., 2012). 1982 wurde HERV-K erstmals im menschlichen Genom entdeckt (Callahan et al., 1982). Man unterteilt HERV-K aufgrund unterschiedlicher Deletionen in zwei Typen (Typ I und II) (Lower et al., 1995). Das Virus codiert für *gag*, *pol*, *env*, die Proteine Pro und Rec oder Np9 (nuclear protein) und kann Virus-ähnliche Partikel produzieren (Lower et al., 1993). Es ist aber aufgrund vieler Mutationen und Deletionen, die im Laufe der Zeit entstanden sind, nicht infektiös (Lower et al., 1996; Tonjes et al., 1997). Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass HERV-K zur Entwicklung von Tumoren beiträgt und es hierbei einen Zusammenhang zwischen der Expression von Rec und der Entstehung von Keimzelltumoren gibt (Buscher et al., 2006; Galli et al., 2005; Sauter et al., 1995; Wang-Johanning et al., 2003). Außerdem wird vermutet, dass die virus-ähnlichen Proteine einen Schutz gegen verwandte exogene Viren darstellen (Langner et al., 2012).

1.4.1. Rec

Das Rec-Protein ist ein 14 kDa großer RNA-Transport-Protein, das in HERV-K Typ II im Nucleoli und im Cytoplasma vorkommt (Lower et al., 1995). Rec besitzt wie sein Analogon Rev ein NLS und ist wichtig für den Export ungespleißter Transkripte zum Cytoplasma (Yang et al., 1999). Dafür bindet es an das Rec-responsive element (RcRE), welches in der U3 Region der 3' untranslatierten Region von HERV-K-Transkripten lokalisiert ist (Magin et al., 1999; Yang et al., 1999). Des Weiteren hat Rec eine Transaktivierungsaktivität bei der Expression des Androgenrezeptors (Hanke et al., 2013a). Ein weiterer Unterschied zwischen Rec und Rev ist, dass Rev im Gegensatz zu Rec keine sequenzspezifische Bindung zum RvRE eingeht und somit die Struktur (*Loop*-Struktur) des RvRE wichtiger ist als die Sequenz (Malim et al., 1990). Bei Rec ist die Protein-Sequenz sehr wichtig für die Bindung an das RcRE, aber auch die Struktur hat einen Einfluss auf den Export (Langner et al., 2012; Magin-Lachmann et al., 2001).

1.5. Staufen-1

Staufen-1 ist ein 55 kDa großes RNA-Transport-Protein, das erstmals in *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde (St Johnston et al., 1991). Es besitzt vier dsRNA-Bindedomänen (RBD2 bis RBD5) und eine Tubulin-Bindedomäne (TBD). Genau wie Rev und Rec erkennt es die zu transportierenden RNAs an einer bestimmten sekundären *Loop*-Struktur (St Johnston et al., 1992). Staufen-1 interagiert mit seiner TBD mit dem Cytoskelett, was ihm den Transport von RNA-Komplexen ermöglicht (Wickham et al., 1999). Zusätzlich hat Staufen-1 regulatorische Funktionen während der Translation (Dugre-Brisson et al., 2005). In Stresssituationen rekrutiert Staufen-1 RNAs in Stressgranula, um damit die Translation von nicht benötigten Proteinen zu stoppen (Thomas et al., 2009). Staufen-1 ist N-terminal mit Polysomen assoziiert (Dugre-Brisson et al., 2005; Luo et al., 2002), welche es in Stresssituationen stabilisiert, um einen stressbedingten Abbau zu verhindern.

Da aus diesem Grund nur ein Teil der Staufen-1-Proteine in die Stressgranula rekrutiert wird, hilft dies bei der Reduzierung der Stressgranulabildung (Thomas et al., 2009). Staufen-1 reguliert also auch die Bildung von Stressgranula. Durch eine Interaktion mit dem viralen Protein Rec, ist Rec in Stresssituationen auch in Stressgranula vorzufinden. Die hierfür essentiell notwendige Domäne ist die RBD4 (Hanke et al., 2013b). Außerdem hat Staufen-1 einen positiven Einfluss auf die Expression von Rec-abhängigen virusRNAs, den nukleären Export und die Translation an den Ribosomen, was die Produktion von HERV-K-Partikeln steigert (Hanke et al., 2013b). Durch Überexpression von Staufen-1 wird dieser Effekt sogar noch verstärkt (Hanke et al., 2013b). Des Weiteren interagiert Staufen-1 auch mit dem viralen Protein Rev. Hierbei spielt die RBD3 eine wichtige Rolle (Chatel-Chaix et al., 2004; Mouland et al., 2000). Die Interaktion von HIV-1 und Staufen-1 trägt zu einer erhöhten HIV-1-Partikelproduktion bei, jedoch nur in einem bestimmten Maß. Überexpression von Staufen-1 wirkt sich negativ auf die Virusinfektiosität aus (Chatel-Chaix et al., 2007; Chatel-Chaix et al., 2004). Staufen-1 interagiert mit HIV-1 durch Bindung an das TAR-Element (Dugre-Brisson et al., 2005; Mouland et al., 2000). Durch die Interaktion mit dem Gag-Protein spielt Staufen-1 auch bei der Encapsidation viraler RNA eine Rolle (Chatel-Chaix et al., 2004).

1.6. Förster/Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Der Physikochemiker Theodor Förster entwickelte die Theorie des Resonanz-Energie-Transfers, weshalb wurde dieser Effekt nach ihm benannt. FRET basiert auf der Annahme, dass die Energie optisch angeregter Moleküle beim Zusammentreffen mit anderen Molekülen aufgrund der Wechselwirkungsenergie zweier Dipole strahlungsfrei übertragen werden kann (Förster, 1948). Diese Übertragung findet bei einem Abstand von 10-70 Å (1 Å=0,1 nm) statt (Kenworthy, 2001). Am besten lässt sich FRET bei einem Abstand zwischen Donor und Akzeptor von unter 10 nm beobachten (Förster, 1948; Stryer, 1978). Daher wird FRET häufig angewandt, um Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) nachzuweisen, da sich so bestimmen lässt, ob die kolokalisierte Proteine wirklich miteinander interagieren. Diese Möglichkeit erkannten Fernandez und Berlin als Erste (Fernandez and Berlin, 1976). Die FRET-Effizienz E ist proportional zur sechsten Potenz des Abstands zwischen Donor und Akzeptor (Förster, 1948; Piston and Kremers, 2007; Selvin, 2000; Stryer, 1978):

$$= r^{-6}/(r^{-6} + R_0^{-6}) \text{ bzw. } = 1/[1 + (r/R_0)^6]$$

Wobei r den Abstand zwischen Donor und Akzeptor angibt und R_0 (Förster Radius) dem Wert entspricht, bei dem die FRET-Effizienz bei 50% liegt. Dieser Wert ist für jedes Fluoreszenzpaar charakteristisch und wird experimentell bestimmt. Für eine möglichst hohe FRET-Effizienz sollten die Spektren der Fluorophore überlappen, der Donor eine hohe Quantenausbeute besitzen, der Akzeptor eine hohe Absorption aufweisen und die Fluorophore möglichst parallel zueinander liegen (Piston and Kremers, 2007; Truong and Ikura, 2001). Außerdem sollten die Fluoreszenzproteine minimal miteinander interagieren. Hierfür gibt es speziell mutierte Fluoreszenzproteine wie *enhanced* CFP (blau fluoreszierendes Protein, engl. *cyan fluorescent protein*) und *enhanced* YFP (gelb fluoreszierendes Protein, engl. *yellow fluorescent protein*) oder *super* CFP (SCFP3A) und *super* YFP (SYFP2) (Kremers et al., 2006; Rizzo et al., 2006).

Eines der besten FRET-Paare ist CFP und YFP, auch wenn bei diesem Paar die Anregungs- und Emissionsspektren stark überlappen. Aufgrund der spektralen Überlappung von Donor und Akzeptor kommt es bei FRET-Messungen oft zum spektralen Durchbluten (auch *bleed-through/ cross-talk* genannt). Hierbei kann z.B. bei der Anregung des Donors auch der Akzeptor angeregt werden oder Fluoreszenz des Donors im Akzeptorkanal detektiert werden. Die verschiedenen Methoden zum Nachweis von FRET weisen unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber *bleed-through* auf. So ist z.B. die intensitätsbasierte Methode (*sensitized emission*) sehr anfällig für *bleed-through*. Bei dieser Methode wird die Akzeptorfluoreszenz gemessen, während der Donor angeregt wird (Karpova et al., 2003). Sie beruht auf der Annahme, dass eine Erhöhung der Akzeptorfluoreszenz zurückzuführen ist, auf eine Energieübertragung von Donor und somit die betrachteten Proteine miteinander in Interaktion treten. Um das Problem mit dem *bleed-through* zu lösen, sind Korrekturalgorithmen entwickelt worden (Gordon et al., 1998; Xia and Liu, 2001). Jedoch kann es dadurch dazu kommen, dass schwache FRET-Signale nicht betrachtet werden (Piston and Kremers, 2007). Eine andere Methode zur Messung von FRET ist die der Photobleichung des Akzeptors (*acceptor photobleaching*) (Gadella and Jovin, 1995; Llopis et al., 2000; Wouters et al., 1998). Hierbei werden die Intensitäten der Donor- und Akzeptorfluoreszenz vor und nach der Photobleichung gemessen und daraus die FRET-Effizienz berechnet (Kenworthy, 2001). Bei der Photobleichung wird der Akzeptor irreversibel zerstört, was dazu führt, dass sich diese Methode nicht für kontinuierliche *in vivo* Messungen (*live cell imaging*) über die Zeit eignet und immer nur eine Messung möglich ist. Normalerweise würde nach einer Bleichung die Fluoreszenz abnehmen, wenn jedoch eine Interaktion vorliegt, ist nach der Bleichung des Akzeptors eine Zunahme der Donor-Emissionswerte zu beobachten (Abbildung 4). Dies ist zurückzuführen auf eine Reduzierung des Energietransfers zum Akzeptor.

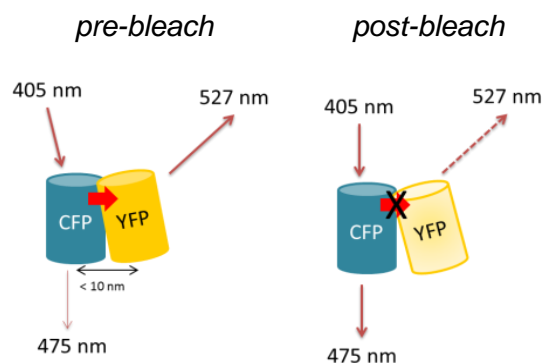


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Methode des Akzeptor-Photobleichens. (pre-bleach) Bei Anregung des Donors (CFP) wird die Energie an den Akzeptor (YFP) weitergeleitet, wenn dieser sich in einem Abstand von unter 10 nm zum Donor befindet. Dieser FRET kann anhand der Akzeptoremission detektiert werden. (post-bleach) Durch die Zerstörung des Akzeptors beim Photobleichen kann die Energie nicht mehr an den Akzeptor übertragen werden und es kommt zu einer Erhöhung der Donoremissionsintensität.

Die Zunahme der Donorfluoreszenz nach der Bleichung des Akzeptors ist ein eindeutiger Beweis für eine Interaktion und lässt sich auch nicht auf eine spektrale Durchblutung des Akzeptors in den Donorkanal zurückführen, da der Akzeptor gebleicht wurde (Karpova et al., 2003). Somit ist diese Methode nicht so anfällig für *bleed-through* wie die intensitätsbasierte Methode, wodurch keine Korrekturalgorithmen nötig sind und schon eine Messung genügen kann, um eine Interaktion zu beweisen. Jedoch müssen für die Messung Donor und Akzeptor in vergleichbarer Intensität vorliegen.

Eine weitere Methode, die ebenfalls weniger anfällig für *bleed-through* ist als die intensitätsbasierte Methode, sich aber auch für *in vivo* Experimente eignet, ist die Methode des *fluorescence life time imaging* (FLIM) (Bastiaens and Squire, 1999; Gadella, 1993; Truong and Ikura, 2001). Sie ist die exakteste Methode und beruht darauf, dass alle Fluorezenzmoleküle über die Zeit eine Abnahme ihrer Fluoreszenz zeigen (Piston and Kremers, 2007). Bei einer Interaktion mit einem fluoreszenten oder nicht fluoreszenten Akzeptor wird die Zeit, in der sich der Donor im angeregten Zustand befindet, verkürzt. Daher wird beim FLIM die Lebenszeit des Donors (Donorfluoreszenz) in Anwesenheit und Abwesenheit des Akzeptors gemessen und miteinander verglichen. Jedoch gestaltet sich die Messung sehr schwierig, da spezielle Instrumente notwendig sind, und die Bildgebung sehr lange dauert. Ferner können Änderungen des pH-Wertes oder Autofluoreszenz im Hintergrund die gemessene Lebenszeit verkürzen und somit verfälschen. Jede Methode zur Messung von FRET hat somit ihre Vor- und Nachteile. Es muss für das jeweilige Ziel eines Experimentes abgewogen werden, welche Methode sich am besten eignet.

1.7. Zielstellung

Die meisten Wirt-Pathogen-Interaktionen basieren auf Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) und bei vielen Viren ist diese PPI für eine optimale Replikation des Virus essentiell (Fruh et al., 2010). Die Untersuchung von PPIs spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von neuen Therapeutika, da die gute Angriffsstellen für Therapeutika darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Interaktion zwischen dem humanen Protein Staufen-1 und den retroviralen Proteinen Rev und Rec mittels FRET-Analyse untersucht werden. Denn auch für diese Proteine ist bekannt, dass wenn der Virus-Wirts-Protein-Komplex in seiner Funktion eingeschränkt wird, es zu keiner Replikation des Virus kommt (Ishaq et al., 2008; Yedavalli et al., 2004). Da im Fachgebiet 18 des Robert Koch-Institutes die Interaktionen der betrachteten Proteine bereits mittels Koimmunpräzipitation und dem Hefe-Zwei-Hybrid-System nachgewiesen und untersucht wurden (Hanke et al., 2013b), sollten nun im Rahmen dieser Arbeit die Interaktionen mit einer weiteren unabhängigen und sehr zuverlässigen Methode, der FRET-Analyse nachgewiesen werden und bestimmt werden, ob die Rev/Rec-Proteine unterschiedlich stark mit Staufen-1 interagieren.

Des Weiteren sollte eine Staufen-1-Verkürzungsmutante kloniert werden, die als biologische Negativkontrolle in FRET-Analysen eingesetzt werden soll.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Software

Gerät	Hersteller, Herkunft
Analysenwaage AC211S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Bakterieninkubator Heraeus B 5028	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
Bakterienschüttelinkubator INFORS HAT Ecotron	Infors, Bottmingen, Schweiz
BioRad Mini Protean II™ vertikale Gelelektrophoresekammer	Bio Rad, München, Deutschland
BioRad Mini-Sub® Cell GT Gelelektrophoresekammer	Bio Rad, München, Deutschland
BioRad Power-PAC 300	Bio Rad, München, Deutschland
ChemoCam Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Eppendorf Mastercycler (PCR-Cycler)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heidolph Duomax 1030 wippender Plattformschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Inkubator Binder 9020-0069	Binder, Tullingen, Deutschland
Inverses Lichtmikroskop ID03	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrowellenherd HF 22023	Siemens, München, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Neubauer <i>improved</i> Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot SD® Semi-Dry Transfer Cell	Bio Rad, München, Deutschland
Waage LP2200P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
ZEISS 780 konfokales Lasermikroskop mit Zeiss ZEN Software 2010	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zellkulturinkubator BBD6220	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
Zellkulturwerkbank HERAsafe	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2. Chemikalien

Substanz	Hersteller, Herkunft
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂ , entwässert)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethansäure (Eisessig)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin (wasserfrei)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES dry substance	Biochrom, Berlin, Deutschland

Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
p-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rotiphorese [®] Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saponin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-amminomethan (Tris-Base oder HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween [®] 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3. Reagenzien

Material	Hersteller, Herkunft
1x PBS (<i>phosphate buffered saline</i>) (8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,44 g/L Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g/L KH ₄ PO ₄)	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
Agarose für DNA-Elektrophorese (Roti [®] garose)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin from chicken egg white, Grade II	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Albumin Grade V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desoxynucleosidtriphosphate dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)-Grundmedium 1x	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
DNA-Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
GelRed [®]	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
L-Glutamin 200 mN für Zellkultur	Biochrom, Berlin, Deutschland
Metafectene [®] Pro	Biotex, München/Laim, Deutschland
Milchpulver, fettarm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4. DNA- und Proteinmarker

Marker	Hersteller, Herkunft
O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Seq GOLD Prestained Protein Marker IV	Peqlab, Erlangen, Deutschland

2.1.5. Enzyme

Enzymbezeichnung	Hersteller, Herkunft
Benzonase [®]	Novagen [®] , Darmstadt, Deutschland
Pfu Ultra Polymerase mit 10x Reaktionspuffer	Stratagene, Cedar Creek, USA
Restriktionsenzym <i>NotI</i>	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland

Restriktionsenzym <i>Xho</i> I	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
T4 DNA Ligase (mit 10x Reaktionspuffer)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Trypsin-EDTA	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
NEBuffer 3.1 (10x)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

2.1.6. Verbrauchsmaterialien/kommerzielle Kits

Material	Hersteller, Herkunft
IBIDI μ -Slides 8 well	IBIDI, München, Deutschland
Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit	Invitex, Berlin, Deutschland
Invisorb [®] Spin DNA Extraction Kit	Stratatec, Berlin, Deutschland
PAP-Pen	G. Kisker, Steinfurt, Deutschland
Pierce ECL-Substrat	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Quiagen Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Whatmanpapier (Blottingpapier), 1,5 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflasche Standard, 75cm ² , 150cm ²	TPP, Transadingen, Schweiz
Duolink [®] II Antikörperverdünnungspuffer	Olink Bioscience, Uppsala, Schweden
Duolink [®] II Detection Reagents Red Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.7. Antibiotika

Antibiotika	Hersteller, Herkunft
Ampicillin 100 mg/ml (Arbeitskonzentration: 100 μ g/ml)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin 50 mg/ml (Arbeitskonzentration: 50 μ g/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 100x sterile Fertiglösung (Arbeitskonzentration 1x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.1.8. Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
DMEM (komplementiert)	DMEM-Grundmedium 1x (2.1.3) Komplementierung: 500 ml FKS (2.1.3) 6 ml L-Glutamin (2.1.3) 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) (2.1.7)
LB (<i>lysogeny borth</i>)-Agarplatten	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton 10 g/l NaCl 10 g/l Agar-Agar

TB (<i>terrific broth</i>)-Medium	24 g/l Hefeextrakt 12 g/l Trypton 4 ml Glycerin 0,1M KHPO ₄
-------------------------------------	---

Die Nährmedien wurden durch die RKI-Nährbodenzentrale hergestellt.

2.1.9. Stammlösungen

Lösung	Zusammensetzung
0,2 % Saponin	0,2 % (w/v) Saponin (2.1.2) in PBS (2.1.3)
10x Laufpuffer für SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	144 g Glycin (2.1.2) 30,2 g Tris-Base (2.1.2) 5 g SDS (2.1.2) mit H ₂ O auf 1 L auffüllen
12 % Trenngel	2,25 ml H ₂ O 9,00 ml Rotiphorese [®] Gel 30 (2.1.2) 11,25 ml 1 M Tris pH 8,8 (2.1.2) 113 µl 20% SDS (2.1.2) 158 µl 10% APS (2.1.2) 13 µl TEMED (2.1.2)
2x HBS	50 mM HEPES (2.1.2) 280 mM NaCl (2.1.2) 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (2.1.2) pH = 7,0
2x SDS-Ladepuffer (Laemmli-Probenpuffer)	50 mM Tris-HCl (pH = 6,8) (2.1.2) 12 % (v/v) Glycerin (2.1.2) 4 % (w/v) SDS (2.1.2) 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol (2.1.2) 0,02 % (w/v) Brilliant Blue G250 (2.1.2)
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 % (w/v) Paraformaldehyd (2.1.2) in PBS
5 % Sammelgel	7,0 ml H ₂ O 1,67 ml Rotiphorese [®] Gel 30 (2.1.2) 1,25 ml 1 M Tris pH 6,8 (2.1.2) 50 µl 20% SDS (2.1.2) 50 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) (2.1.2) 10 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) (2.1.2)
50x TAE-Puffer für Agarose-Gelelektrophorese	2 M Tris-Base (2.1.2) 1 M Ethansäure (2.1.2) 50 mM EDTA (2.1.2)
6 %ige Magermilch Mounting-Medium	6 % (w/v) Milchpulver (2.1.3) in H ₂ O 90 % Glycerin (2.1.2) 10 % PBS (2.1.3) 1 % (w/v) p-Phenylendiamin (2.1.2)
PLA BSA/Chicken-Blockierungspuffer	2 % (w/v) BSA Grade V (2.1.3) 3 % (w/v) Chicken Albumin (2.1.3) in PBS (2.1.3)

PLA-Waschpuffer A	8,8 g NaCl (2.1.2) 1,2 g Tris-Base (2.1.2) 0,5 ml Tween [®] 20 (2.1.2) 1000 ml H ₂ O pH = 7,4
PLA-Waschpuffer B	5,84 g NaCl (2.1.2) 4,24 g Tris-Base (2.1.2) 26,0 g Tris-HCl (2.1.2) 1000 ml H ₂ O pH = 7,5
PLA-Waschpuffer C	10 ml PLA-Waschpuffer B (2.1.9) 990 ml H ₂ O
Transferpuffer	28,8 g Glycin (2.1.2) 200 ml Methanol (2.1.2) 6,04 g Tris-Base (2.1.2) mit H ₂ O auf 1 L auffüllen
Waschpuffer	0,1 % (v/v) Tween [®] (2.1.2) in PBS (2.1.3)

2.1.10. Organismen

Organismus/Zelllinie	Hersteller, Herkunft
<i>E.coli</i> (<i>Escherichia coli</i>) XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
<i>E.coli</i> XL10-Gold	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
HEK293T-Zellen (<i>human embryonic kidney 293T cells</i>)	P13, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
HeLa (Henrietta Lacks)-Zellen	NG5, Robert Koch-institut, Berlin, Deutschland

2.1.11. Antikörper

2.1.11.1. Primäre Antikörper

Antigen	Organismus	Anwendung	Hersteller, Herkunft
FLAG (A8592-1MG)	<i>mouse</i>	Western Blot	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FLAG (DYDDDDK) (NB600-344)	<i>goat</i>	PLA	NovusBio, Littleton, USA
V5 (MCA1360)	<i>mouse</i>	Western Blot, PLA	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
GFP	<i>rabbit</i>	Western Blot	Abcam, Cambridge, UK

2.1.11.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Anwendung	Hersteller, Herkunft
Duolink [®] II PLA Probe anti-Goat MINUS	PLA	Olink Bioscience, Uppsala, Schweden
Duolink [®] II PLA Probe anti-Mouse PLUS	PLA	Olink Bioscience, Uppsala, Schweden
Rabbit anti-Mouse IgG HRP-konjugiert	Western Blot	Dako, Hamburg, Deutschland
Goat anti-Rabbit IgG HRP-konjugiert	Western Blot	Dako, Hamburg, Deutschland

2.1.12. Primer

Primerbezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Staufen-Mutante1-rev	TTTTTCTCGAGATTGCGCTTGCCACCT
Staufen-Mutante2-rev	TTTTTCTCGAGCGGTAACCTTCTTCAGCTCCT
Staufen-V2-for	GCGGCCGCCACCATGGATTACAAGGATG

Alle Primer sind von der Firma SIGMA hergestellt worden.

2.1.13. Vektoren

Vektorbezeichnung	Hersteller, Herkunft
pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1	Dr. Daniel Ivanusic, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 2	Dr. Daniel Ivanusic, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1	Dr. Daniel Ivanusic, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 2	Dr. Daniel Ivanusic, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
pCDNA4B-SIV-Rev-CFP	Dr. Daniel Ivanusic, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
pCDNA-CFP	Dr. Daniel Ivanusic, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland (Ivanusic et al., 2014)
pCMVTag2B-Staufen-1-YFP	Dr. Daniel Ivanusic, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
pCMV-YFP	Dr. Daniel Ivanusic, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland (Ivanusic et al., 2014)
pECFP-EYFP	Michael Schindler (Banning et al., 2010)

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung und Stammhaltung von Organismen

2.2.1.1. E.coli

Die *Escherichia coli* (E.coli) Bakterien des Typs XL1-Blue oder XL10-Gold (2.1.10) wurden zur Plasmidreplikation verwendet und hierfür auf LB-Agarplatten (2.1.8) oder zur höheren Plasmidausbeute in TB-Medium (2.1.8) mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum (Kanamycin oder Ampicillin (2.1.7)) kultiviert. Beimpft wurde mit einer Glycerinkultur oder Einzelkolonie mittels einer Einwegimpföse. Die Kulturen wurden bei 37 °C im Bakterieninkubator (2.1.1) oder Bakterienschüttelinkubator (2.1.1) über Nacht bebrütet. Die bebrüteten Agarplatten wurden für eine kurzzeitige Lagerung von bis zu 4 Wochen bei 4 °C mit Parafilm verschlossen. Für eine dauerhafte Lagerung der Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 250 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl sterilem 80%igen Glycerin in einem Cryoröhrchen vermischt und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2. Humane Zelllinien

Die HEK293T (*human embryonic kidney 293T*)-Zellen und HeLa (Henrietta Lacks)-Zellen wurden in Kulturflaschen (2.1.6) mit DMEM (2.1.8), komplementiert mit FKS (2.1.3), L-Glutamin (2.1.3) und Penicillin/Streptomycin (2.1.7) im Zellkulturinkubator (2.1.1) bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Da es sich bei diesen Kulturen um adhärenzte Zellkulturen handelt, mussten die Zellen zur Vereinzelung und Umsetzung (ugs. splitten) mit Trypsin-EDTA (2.1.5) trypsiniert werden. Im Anschluss wurden die trypsinierten Zellen zusammen mit DMEM (2.1.8), zum Stoppen der Enzymreaktion, in Falcontubes (Zentrifugenröhrchen) gegeben. Die Zellen wurden dann bei Raumtemperatur für 5 min bei 800 rpm in der Zentrifuge (2.1.1) abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 1x PBS (2.1.3) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in frischem Medium resuspendiert. Hiervon wurde je nach Zellmaterialmenge ein bestimmtes Volumen in neue Kulturflaschen gegeben und weiterkultiviert. Für eine langfristige Einlagerung von Zellen wurden diese in fötales Kälberserum (FKS) (2.1.3) überführt, auf Eis gestellt und dann tropfenweise bis zum Erreichen einer Konzentration von 10 % mit DMSO (2.1.2) versetzt. 1 ml dieses Zell-FKS-DMSO-Gemisches wurde in ein Cryoröhrchen gegeben, über Nacht in einem Kühlblock bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl von humanen Zellen

Die Bestimmung der Zellen pro ml erfolgte mittels der Neubauer *improved* Zählkammer (2.1.1). Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension zwischen das aufgelegte, optisch plan geschliffene Deckglas und die Zählkammer gegeben. Dann wurden mittels des inversen Lichtmikroskops (2.1.1) die vier Großquadrate (entspricht je 16 Kleinquadraten) ausgezählt und aus den vier Zählungen der Mittelwert $\bar{N}_{\text{Zellen/Quadrat}}$ gebildet.

$$\bar{N}_{\text{Zellen/Quadrat}} = \frac{\text{Zellen Quadrat 1} + \text{Zellen Quadrat 2} + \text{Zellen Quadrat 3} + \text{Zellen Quadrat 4}}{4}$$

2.2.2. Arbeiten mit DNA

2.2.2.1. Plasmidisolierung aus E.coli

Es wurden E.coli XL1-Blue bzw. XL10-Gold (2.1.10) mit dem gewünschten Plasmid und Resistenzmarkern (Kanamycin- oder Ampicillinresistenz) in TB-Medium (2.1.8), versetzt mit dem jeweiligen Antibiotikum (Kanamycin oder Ampicillin (2.1.7)), vermehrt. Die Plasmidisolierung erfolgte dann mittels Quiagen Plasmid Maxi Kit (2.1.6) oder in kleinerem Maßstab mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit (2.1.6) nach dem Protokoll des Herstellers. Eluiert wurden die Plasmide mit sterilem Reinstwasser.

2.2.2.2. DNA -Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration $c(\text{DNA})$ und Reinheit $A_{260/280}$ isolierter DNA (Desoxyribonukleinsäure) wurde spektroskopisch mit dem NanoDrop[®] (2.1.1) bestimmt. Hierfür wurde steriles Reinstwasser als Nullwert (*blank*) verwendet, da die DNA in sterilem Reinstwasser eluiert wurde. Die Messung wurde mit 1 μl der DNA-Lösung durchgeführt. Die $A_{260/280}$ -Werte lagen zwischen 1,8 und 1,9, was einem Nukleotidanteil 40-60 % entspricht und nachweist, dass die isolierte DNA frei von Proteinen ist (Glasel, 1995).

2.2.2.3. PCR

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) können definierte DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden (Mullis et al., 1986). Hierzu werden zwei Primer (kurze Oligonukleotide), die eine Homologie zum 3'- bzw. 5'-Ende des Zielabschnittes (*template*) aufweisen, eingesetzt. Zusätzlich enthält der PCR-Ansatz eine hitzebeständige DNA-Polymerase, dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) und einen PCR-Puffer. In dieser Arbeit wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

50 ng	DNA
1 μl	Pfu Ultra Polymerase (2.1.5)
5 μl	10 x PCR-Puffer (2.1.5)
0,2 μM	forward Primer (2.1.12)
0,2 μM	reverse Primer (2.1.12)
250 μM	dNTPs (2.1.3)
xx μl	H ₂ O
<hr/>	
50 μl	

Durch die zyklische Wiederholung von Denaturierung, Hybridisierung (Annealing) und Kettenverlängerung (Elongation) kommt es zur Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments (Mullis et al., 1986). Hierfür wurde im PCR-Cycler (2.1.1) ein bestimmtes PCR-Programm (Tabelle 2) eingestellt.

Tabelle 2: PCR-Bedingungen

Schritt	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Initiale DNA-Denaturierung	95 °C	3 min
2	DNA-Denaturierung	94 °C	30 sec
3	Annealing	58 °C	30 sec
4	Elongation	72 °C	45 sec
5	Finale Elongation	72 °C	3 min
6	Kühlung	4 °C	bis zur Weiterverarbeitung

} 35 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (2.2.2.4) aufgetrennt.

2.2.2.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Bei der Agarose-Gelelektrophorese kommt es mit Hilfe eines elektrischen Feldes zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten (Lumpkin et al., 1985). Da die DNA durch ihr Zucker-Phosphat-Rückgrat negativ geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Auftrennung erfolgt durch ein dreidimensionales Netz aus Agarose aufgrund der unterschiedlichen Ionenbeweglichkeiten der DNA-Fragmente. Diese Verteilung der DNA-Fragmente ist abhängig von ihrer molekularen Größe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurde Agarose (2.1.3) mit 1x TAE (2.1.9) vermischt und in der Mikrowelle (2.1.1) erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach einer kurzen Abkühlphase wurden 3 µl GelRed® (2.1.3) zu je 50 ml Agarosegel-Lösung hinzugegeben und dann das Gel gegossen. Der Farbstoff GelRed® wird benötigt, um die DNA-Fragmente als fluoreszierende Banden sichtbar zu machen. Die Gelkammer (2.1.1) wurde mit 1x TAE (2.1.9) aufgefüllt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (2.1.3) versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde in eine Geltasche ein DNA-Marker (2.1.4, Anhang) pipettiert, um die Größen der DNA-Fragmente näherungsweise bestimmen zu können. Die Gele wurden mittels BioRad Power-PAC 300 (2.1.1) bei 90-110 V aufgetrennt und nachfolgend mit Hilfe der ChemoCam mit eingebautem UV-Transilluminator (2.1.1) ausgewertet.

2.2.2.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Invisorb® Spin DNA Extraktions Kit (2.1.6). Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Eluiert wurden die DNA-Fragmente mit sterilem Reinstwasser.

2.2.2.6. Restriktionsverdau

Im Rahmen von Klonierungsexperimenten und zur Kontrolle von Klonierungen kam der Restriktionsverdau zum Einsatz. Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

1-4 µg	DNA
1 µl	<i>XhoI</i> (2.1.5)
1 µl	<i>NotI</i> (2.1.5)
5 µl	3.1 buffer (2.1.5)
xx µl	H ₂ O
<hr/>	
50 µl	

Inkubiert wurde der Ansatz über Nacht bei 37 °C im Bakterieninkubator (2.1.1). Im Anschluss wurden die verdauten DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.4) aufgetrennt.

2.2.2.7. Ligation

Die restringierten DNA-Fragmente wurden mittels Ligation zusammengefügt. Hierfür sollte das Insert im dreifachen Überschuss zum Vektor vorliegen. Dies wurde mit folgender Formel berechnet:

$$m(\text{Insert}) = \frac{m(\text{Vektor}) \times \text{bp}(\text{Insert})}{\text{bp}(\text{Vektor})} \times \frac{3}{1}$$

Anschließend wurde der Ligationsansatz wie folgt zusammengestellt:

100 ng	Vektor
xx ng	Insert
2 µl	Ligase (2.1.5)
5 µl	10x Ligationspuffer (2.1.5)
xx µl	H ₂ O
<hr/>	
50 µl	

Der Ligationsansatz wurde dann 1 h bei Raumtemperatur und danach über Nacht bei 16 °C im PCR-Cycler (2.1.1) inkubiert.

2.2.2.8. Transformation

Ein Aliquot von 120 µl chemokompetenter E.coli XL10-Gold (2.1.10) wurde mit dem gesamten Ligationsansatz (2.2.2.7) versetzt und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Hierbei lagern sich DNA-Moleküle an die Bakterienzelle an. Beim anschließenden Hitzeschock (90 s bei 42 °C im Thermomixer (2.1.1)) gelangt die DNA in die Bakterienzellen. Als nächstes wurden 200 µl TB-Medium (2.1.8) hinzugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37 °C im Bakterieninkubator (2.1.1) inkubiert, damit die Antibiotikaresistenzen ausgebildet werden

konnten. Um die positivtransformierten Bakterien zu selektieren, wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum (2.1.8) ausplattiert. Danach wurden die Agarplatten bei 37 °C über Nacht bebrütet.

2.2.2.9. Sequenzierung von DNA-Molekülen

DNA-Moleküle wurden mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) sequenziert. Das Sequenzierungslabor des RKIs verwendet dafür das Kapillarelektrophoresesystem mit dem Big Dye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

1 µl	DNA
(150-300 ng Plasmid-DNA)	
0,5 µl	forward oder reverse Primer
1 µl	BigDye [®] reaction mix
3 µl	5x ABI-Puffer
xx µl	H ₂ O
<hr/>	
20 µl	

Im Anschluss wurde mit dem PCR-Ansatz im PCR-Cycler (2.1.1) eine PCR nach dem ausgegebenen Protokoll des Sequenzierungslabors durchgeführt (Tabelle 3).

Tabelle 3: PCR-Bedingungen bei der Sequenzierung von DNA-Molekülen

Schritt	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Initiale DNA-Denaturierung	96 °C	2 min
2	DNA-Denaturierung	96 °C	10 sec
3	Annealing	50-55 °C	5 sec
4	Elongation	60 °C	4 min
5	Kühlung	4 °C	∞

} 25 Zyklen

2.2.2.10. Klonierung

Für die Klonierung der Staufen-1-Verkürzungsmutante wurde zuerst das Insert mit geeigneten Primern (2.1.12) mittels PCR (2.2.2.3) von dem *template* (pCMVTag2B-Staufen-1-YFP) amplifiziert. Dann wurde der PCR-Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.4) aufgetrennt, die Amplifikate mit der richtigen Basenpaarlänge herausgeschnitten (Tabelle 4) und aufgereinigt (2.2.2.5). Die Amplifikate wurden danach mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI (2.1.5) restringiert und im Anschluss wieder elektrophoretisch (2.2.2.4) aufgetrennt und aufgereinigt (2.2.2.5). Schließlich konnten die restringierten Amplifikate und der restringierte Vektor (pCMVTag2B-Staufen-1-YFP) (2.1.13) ligiert (2.2.2.7) werden. Der Ligationsansatz konnte nun in chemokompetente *E.coli* transformiert (2.2.2.8) werden. Anschließend wurde das Plasmid aus den *E.coli* isoliert (2.2.2.1) und sequenziert (2.2.2.9).

Tabelle 4: Verwendete Primer zur Generierung der Staufen-Verkürzungsmutanten

Vektorbezeichnung	Länge	forward und reverse Primer (2.1.12)
pCMV-Staufen-Mutante1-YFP	876 bp	Staufen-V2-for, Staufen-Mutante1-rev
pCMV-Staufen-Mutante2-YFP	606 bp	Staufen-V2-for, Staufen-Mutante2-rev

2.2.3. Arbeiten mit Proteinen

2.2.3.1. Transfektion

2.2.3.1.1. Transfektion mittels Transfektionsreagenz

HEK29T und HeLa-Zellen (2.1.10) wurden mit der Transfektionsreagenz Metafectene[®] Pro (2.1.3) bei 80%iger Konfluenz transfiziert. Für die im 6 well angezogenen Zellen für Western-Blot-Analysen wurde angelehnt an das Protokoll des Herstellers 100 µl Medium, 3 µl Metafectene[®] Pro und 3 bzw. 6 µg Vektor-DNA (2.1.13) verwendet. Hingegen wurden für die im 8 slide well angezogenen Zellen für die FRET-Analysen 50 µl Medium, 2 µl Metafectene[®] Pro und 0,5 µg DNA eingesetzt. Die transfizierten Zellen wurden unter definierten Bedingungen (2.2.1.2) für 15-48 h inkubiert.

2.2.3.1.2. Transfektion mit Calciumphosphat

Für die Transfektion mit Calciumphosphat wurden zwei Ansätze vorbereitet:

Ansatz A

100 µl 2xHBS (2.1.9)

Ansatz B

5-10 µg	DNA
12,2 µl	2 M CaCl ₂ (2.1.2)
xx µl	H ₂ O
<hr/>	
100 µl	

Ansatz B wurde dann tropfenweise in Ansatz A geben. Damit sich die DNA/Calcium Phosphat-Komplexe bilden können, wurde das Gemisch für 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gemisch in einen 6 well mit HeLa-Zellen (2.1.10), welche 5 Stunden vorher ausgesät wurden, gegeben. Die transfizierten HeLa-Zellen wurden dann für 12-36 h unter definierten Bedingungen (2.2.1.2) inkubiert.

2.2.3.2. Probenvorbereitung zum Nachweis spezifischer Proteine

Als erstes wurde das Medium aus dem 6 well mit den transfizierten HEK293T- bzw. HeLa-Zellen (2.1.10) entfernt. Dann wurden die transfizierten Zellen mit 80 µl 2x Laemmli Puffer (2.1.9) lysiert und anschließend die chromosomale DNA durch Hinzufügen von 1 µl Benzonase[®] (2.1.5) entfernt (Ivanušić, 2015). Die Zelllysate wurden dann in 1,5 ml

Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C tiefgefroren. Vor dem Einsatz in der SDS-Page (2.2.3.3) wurden die Zelllysate mit 2 µl β-Mercaptoethanol versetzt und für 5 min bei 95 °C auf dem Thermomixer (2.1.1) denaturiert. Dies ist wichtig, da die Proteine für die SDS-Page in der Primärstruktur vorliegen müssen.

2.2.3.3. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) verwendet (Laemmli, 1970). Hierbei spielt das anionische Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat, engl. sodium dodecyl sulfate) eine wichtige Rolle, da es sich an die hydrophoben Teile der Proteine anlagert und somit die Eigenladung der Proteine überdeckt. Die Proteine weisen nun eine gleichstarke negative Ladung auf und wandern somit molekulargewichts-abhängig unterschiedlich schnell durch die vernetzte Polyacrylamidmatrix zum Pluspol.

Die Gele für die SDS-Page wurden selbst hergestellt. Hierzu wurde die Gelform zu $\frac{3}{4}$ mit einem 12%igen Trenngel (2.1.9) befüllt und mit Isopropanol bedeckt. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, die Gelkammer mit einem 5%igen Sammelgel aufgefüllt und der Kamm eingesetzt. Die auspolymerisierten Gele wurden bis zur Verwendung in ein nasses Papiertuch eingewickelt und bei 4 °C gelagert.

Für die SDS-Page wurde die vertikale Gelelektrophoresekammer (2.1.1) mit 1x Laufpuffer befüllt. Hierzu musste der 10x Laufpuffer (2.1.9) verdünnt werden. Das SDS-Gel wurde mit je 10 µl der Proben beladen. Um das Molekulargewicht der Proteine abschätzen zu können, wurde zusätzlich noch ein Proteinmarker (2.1.4, Anhang) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte anfangs bei 100 V und als die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten bei 190 V.

2.2.3.4. Western-Blot-Analyse

Die Detektion von Proteinen aus Zelllysaten beruht auf der Methode des Western-Blottings. Bei dieser Methode werden Proteine von einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulosemembran oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen (Towbin et al., 1979) und anschließend einer für das Protein spezifischen Nachweisreaktion mit Antikörpern unterzogen. Hierzu müssen die Proteine zuerst mittels SDS-Page (2.2.3.3) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine dann vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran durch das sogenannte „semi-dry“-Blotverfahren (Gultekin and Heermann, 1988) mittels Trans-Blot SD[®] Semi-Dry Transfer Cell (2.1.1) übertragen. Hierfür wurde die PVDF-Membran in 99%iges Methanol gelegt, zwei Whatmanpapiere (2.1.6) als Blotpapier in Transferpuffer (2.1.9) und das zugeschnittene Trenngel (überschüssiges Gel und Sammelgel mit einem Skalpell entfernt) ebenfalls in Transferpuffer. Dann wurden das Gel und die Membran zwischen die beiden Whatmanpapiere gelegt und so auf die Blottingmaschine gelegt, dass die Membran unter dem Gel liegt. Geblottet wurde bei einer Spannung von 20 V für 30 min. Nach dem Blotten wurden unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran mittels 30 minütigem Einlegen in 6%iger Magermilch (2.1.9) bei Raumtemperatur auf dem wippenden

Plattformschüttler (2.1.1) blockiert. Im Anschluss wurden die PVDF-Membranstücke, die Proteine mit einem V5-Tag enthalten, über Nacht bei 4 °C mit dem spezifischen Primärantikörper (2.1.11.1) und 6%iger Magermilch im Verhältnis 1:5000 auf dem wippenden Plattformschüttler (2.1.1) inkubiert. Die Membranstücke, die Proteine mit einem FLAG-Tag enthalten, wurden für 1,5 h mit dem spezifischen Antikörper (2.1.11.1) und 6%iger Magermilch im Verhältnis 1:5000 inkubiert. Danach wurden die Membranstücke dreimal für 10 min in Waschpuffer (2.1.9) gewaschen und anschließend die Immunreaktion mittels ECL (*enhanced chemoluminescence*)-Substrat (2.1.6) detektiert. Hierfür wurde die ECL-Lösung nach Herstellerangaben vorbereitet und die PVDF-Membran kurz in der ECL-Lösung inkubiert. Die Chemolumineszenz der PVDF-Membran wurde mit der ChemoCam (2.1.1) betrachtet und aufgenommen. Am nächsten Tag wurden die Membranstücke, die Proteine mit einem V5-Tag enthalten, dreimal für 10 min in Waschpuffer (2.1.9) gewaschen und dann für 45 min bei Raumtemperatur mit dem spezifischen Sekundärantikörper (2.1.11.2) und 6%iger Magermilch in einem Verhältnis von 1:2000 auf dem wippenden Plattformschüttler (2.1.1) inkubiert. Danach wurden die Membranstücke erneut dreimal für 10 min in Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde wie bei den Membranstücken, die Proteine mit einem FLAG-Tag enthalten, verfahren und die Immunreaktion mittels ECL-Substrat (2.1.6) und ChemoCam (2.1.1) betrachtet.

2.2.3.5. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und FRET-Analyse

Die subzelluläre Lokalisation der Expression der mit Fluorophoren fusionierten Proteine konnte mittels konfokaler Laser-Mikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, cLSM) betrachtet werden. Hierbei wurden die Fluorophore mit Lasern angeregt, die monochromatisches Licht einer definierten Wellenlänge mit hoher Intensität emittieren (Tabelle 5). Es wurde das inverse ZEISS 780 konfokale Lasermikroskop (2.1.1) mit Unterstützung der Zeiss ZEN Software 2010 (2.1.1) verwendet. Bei den in dieser Arbeit betrachteten Proteinen wurde die Fluoreszenz durch CFP und YFP erzeugt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Verwendete Anregungswellenlängen und Emissionswellenlängen

Fluoreszenzkanal	Anregung (excitation)	Emissionsdetektierung (emmission)
CFP	405 nm Diodenlaser	454-516-nm Bandbreite
YFP	514 nm Argonlaser	519-621-nm Bandbreite

Für die FRET-Analyse wurden HEK293T- bzw. HeLa-Zellen (2.1.10) in IBIDI μ -Slides 8 well (2.1.6) ausgesät und mit Donor und Akzeptor Plasmid-DNA einzel- bzw. kotransfiziert (Tabelle 6, 2.2.3.1.1). Nach 15-36 h wurden die Zellen für 10-20 min mit 4% PFA (2.1.9) fixiert.

Tabelle 6: Transfektionsschema zur Ermittlung der FRET-Effizienzen

Donor	Akzeptor	Donor+Akzeptor
pCDNA4B-SIV-Rev-CFP	pCMVTag2B-Staufen-1-YFP	pCDNA4B-SIV-Rev-CFP + pCMVTag2B-Staufen-1-YFP
pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1	pCMVTag2B-Staufen-1-YFP	pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1 + pCMVTag2B-Staufen-1-YFP
pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1	pCMVTag2B-Staufen-1-YFP	pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1 + pCMVTag2B-Staufen-1-YFP
pCDNA4B-SIV-Rev-CFP	pCMV-Staufen-1-Mutante2-YFP	pCDNA4B-SIV-Rev-CFP + pCMV-Staufen-1-Mutante2-YFP
pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1	pCMV-Staufen-1-Mutante2-YFP	pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1 + pCMV-Staufen-1-Mutante2-YFP
pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1	pCMV-Staufen-1-Mutante2-YFP	pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1 + pCMV-Staufen-1-Mutante2-YFP
pCDNA-CFP	pCMV-YFP	pCMV-YFP + pCDNA-CFP pECFP-EYFP

Bei der Photobleichung des Akzeptors wurde das CFP im Multitrack-Channel-Modus bei 405 nm mit 1,8 % Laserleistung angeregt und die Emission bei 463-509 nm detektiert und das YFP bei 514 nm mit 0,5 % Laserleistung angeregt und die Emission bei 515-611 nm detektiert. Zur Erfassung der CFP-Intensitätswerte wurden drei Aufnahmen gemacht. Danach wurde die Intensität des 514 nm Argonlasers auf 100 % erhöht und weitere Aufnahmen mit dieser Einstellung gemacht. Die resultierenden FRET-Effizienzwerte wurden mittels des in der Zeiss ZEN 2010 Software implementierten FRET-Makros berechnet.

2.2.3.6. Proximity ligation assay (PLA)

Um die Interaktion zwischen den betrachteten Proteinen mit einer weiteren Methode nachzuweisen, wurde ein PLA durchgeführt (Gustafsdottir et al., 2005). Beim PLA werden die Proteine mit Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies markiert. Diese werden dann von Sekundärantikörpern erkannt, die mit jeweils einem Oligonukleotid konjugiert sind. Befinden sich die Proteine in unmittelbarer Nähe, so können die Oligonukleotide mittels einer Ligation ligiert werden und anschließend durch die ϕ -Polymerase in einer Rolling-Circle-Amplifikation-Reaktion hundertfach amplifiziert werden (Baner et al., 1998; Schweitzer et al., 2000). Die amplifizierte zirkuläre DNA wird nachfolgend mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit fluoreszierenden Sonden nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für den PLA wie bei der FRET-Analyse HEK293T-Zellen (2.1.10) ausgesät und mit Donor und Akzeptor Plasmid-DNA einzel- bzw. kotransfiziert (Tabelle 6, 2.2.3.1.1). Nur wurden für die PLA die Zellen in 6 wells ausgesät und mit je 3 μ g DNA transfiziert. Nach einer 48 stündigen Inkubation (2.2.1.2) wurden die Zellen mit 4%igen PFA (2.1.9) fixiert, mit PBS (2.1.3) gewaschen und in 300 μ l PBS durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgenommen. Diese Zellsuspensionen wurden auf die mit dem PAP-Pen (2.1.6) markierten Kreise auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern (2.1.6) getropft und bei 37 °C im Inkubator (2.1.1) getrocknet. Als nächstes wurden die auf dem Objektträger befindlichen Zellen für 30 min mit 0,2 % Saponin (2.1.9) in der Färbekammer permeabilisiert und dann mit PLA BSA/Chicken Blockierungspuffer (2.1.9) für 2 h in der Färbekammer geblockt. Im Anschluss wurden die Zellen mit den Primärantikörpern Anti-V5 (5 μ g/ml) (2.1.11.1) und Anti-FLAG (5 μ g/ml) (2.1.11.1) in der Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht

inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal für 10 min mit PLA-Waschpuffer A (2.1.9) in der Färbekammer gewaschen und im Anschluss unter leichtem schütteln für 2 h in PLA-Waschpuffer A (2.1.9) gewaschen. Danach wurden die Zellen für 1 h in PLA BSA/Chicken Blockierungspuffer (2.1.9) blockiert. Darauf folgte eine einstündige Inkubation in der Feuchtkammer mit den Sekundärantikörpern (2.1.11.2). Hierfür wurden für jede Probe 8 µl Duolink® II PLA Probe anti-Mouse PLUS (2.1.11.2), 8 µl Duolink® II PLA Probe anti-Goat MINUS (2.1.11.2) und 24 µl Duolink® II Antikörperverdünnungspuffer (2.1.6) vermischt und auf die Zellen getropft. Vor der anschließenden Ligation wurden die Zellen dreimal für 20 min mit PLA-Waschpuffer A (2.1.9) unter leichtem Schütteln in der Färbekammer gewaschen. Für die Ligation wurden für jede Probe 8 µl Duolink® II Ligationspuffer und 1 µl Ligase aus dem Duolink® II Detection Reagents Red Kit (2.1.6) mit 31 µl H₂O vermischt und danach direkt auf die Zellen getropft. Die Ligation erfolgte bei 37 °C in der Feuchtekammer im Bakterieninkubator (2.1.1) für 45 min. Nach kurzem Waschen mit PLA Waschpuffer A erfolgte die Amplifikation. Hierfür wurden für jede Probe 8 µl 5x Duolink II Amplifikations Stock und 0,5 µl Polymerase aus dem Duolink® II Detection Reagents Red Kit (2.1.6) mit 31,5 µl H₂O vermischt und auf die Zellen getropft. Anschließend wurden die Zellen für 100 min in der Feuchtekammer im Bakterieninkubator (2.1.1) bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen drei mal 20 min mit PLA-Waschpuffer B in der Färbekammer unter leichtem Schütteln gewaschen und danach noch für 10 min mit PLA-Waschpuffer C. Die Objektträger wurden dann zum Trocknen in den Inkubator (2.1.1) gelegt. Als letztes wurde auf jeden Objektträger 10 µl Mounting-Medium (2.1.9) in die Mitte des markierten Kreises getropft, ein Deckgläschen aufgelegt und dieses mit durchsichtigem Nagellack fixiert. Die Objektträger wurden dann bis zur Betrachtung unter dem Konfokalmikroskop im Dunkeln bei 4 °C gelagert (Ivanusic et al., 2016).

2.2.4. Berechnung der Standardabweichung

Die Standardabweichung (SD) ist ein Maß für die Streuung des Mittelwertes und wird mit folgender Formel berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

n entspricht hierbei der Anzahl der Werte (Stichprobenumfang), x dem Einzelwert der Stichprobe und \bar{x} dem arithmetischen Mittel. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Standardabweichung mittels der Software EXCEL von Microsoft mit der Funktion STABW berechnet.

2.2.5. Berechnung des Signifikanzwerts (*p-value*)

Um zu prüfen, ob es statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten gibt, wurde der t-Test nach William Sealy Gosset (Student, 1908) angewendet. Bei einem Signifikanzwert (*p-value*) von $p < 0,05$ wird von einem signifikanten Unterschied zwischen zwei Wertegruppen ausgegangen, denn ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 5 %, dass die Mittelwerte sich nur zufällig unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *p-value* mittels der Software EXCEL von Microsoft mit der Funktion TTEST berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis der Proteinexpression der Akzeptor- und Donor-Fluoreszenzproteine

3.1.1. Nachweis der Proteinexpression der Akzeptor- und Donor-Fluoreszenzproteine mittels Western Blot-Analyse

Die Expression der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzproteine wurde in HEK293T-Zellen (Abbildung 5) und HeLa-Zellen (Abbildung 6) mittels Western Blot-Analyse (2.2.3.2, 2.2.3.3, 2.2.3.4) untersucht.

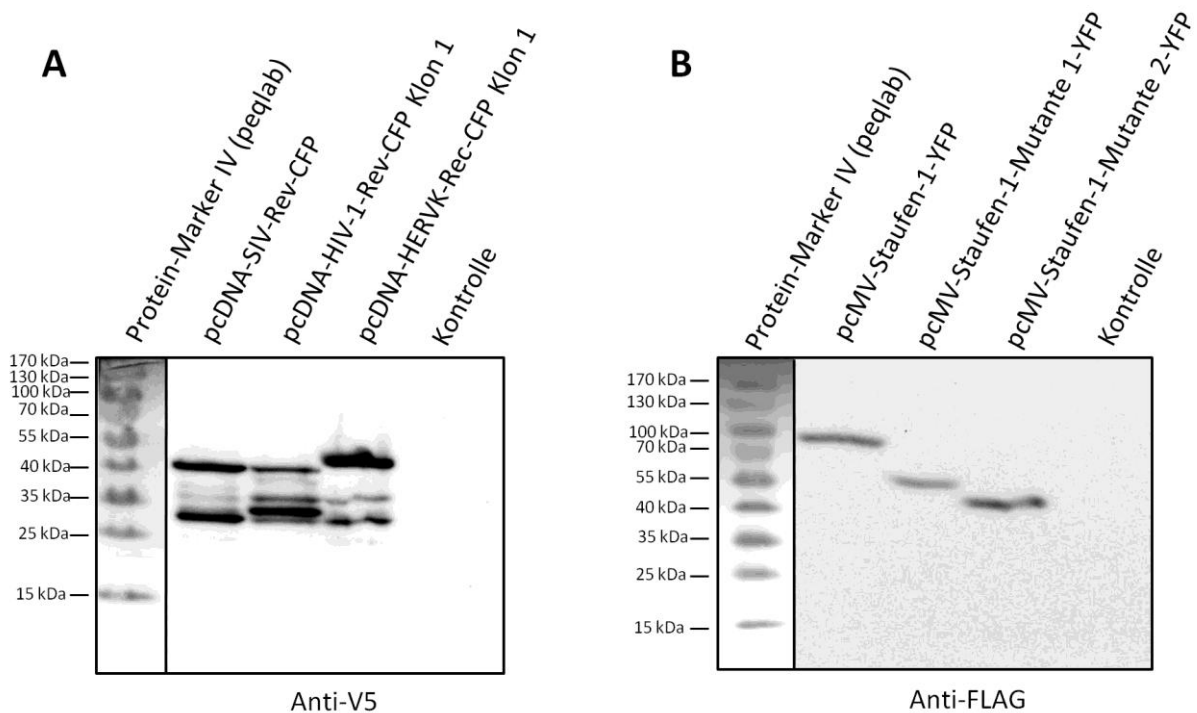


Abbildung 5: Western Blot-Analyse zum Nachweis der Expression von Akzeptor- (A) und Donor-Fluoreszenzproteinen (B) in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit 3 µg Vektor-DNA mittels Metafectene[®] Pro transfiziert und nach 24 h analysiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Es wurden je 10 µL Zelllysate aufgetragen. Die Proteine wurden mit den Primärantikörpern Mouse anti-V5 (A) bzw. Mouse anti-FLAG (B) in einem Verhältnis von 1:5000 detektiert. Der Primärantikörper Mouse anti-V5 (A) wurde wiederum mit dem Sekundärantikörper Rabbit anti-Mouse IgG HRP-konjugiert (A) in einem Verhältnis von 1:2000 detektiert.

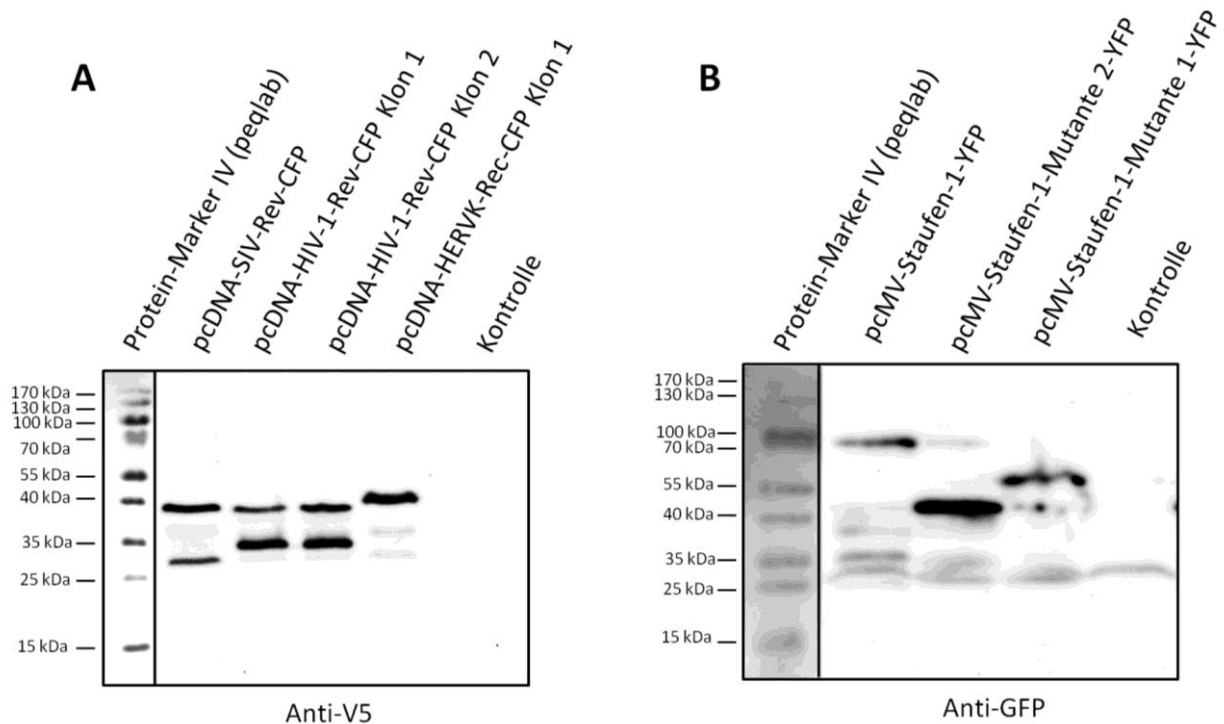


Abbildung 6: Western Blot-Analyse zum Nachweis der Expression von Akzeptor- (A) und Donor-Fluoreszenzproteinen (B) in HeLa-Zellen. (A) HeLa-Zellen wurden mit 6 µg Vektor-DNA mittels Metafectene® Pro transfiziert, nach 24 h nachtransfiziert und nach insgesamt 48 h analysiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Es wurden je 10 µL Zellysat aufgetragen. Die Proteine wurden mit dem Primärantikörper Mouse anti-V5 in einem Verhältnis von 1:5000 detektiert und dieser wurde wiederum mit dem Sekundärantikörper Rabbit anti-Mouse IgG HRP-konjugiert in einem Verhältnis von 1:2000 detektiert. (B) HeLa-Zellen wurden mit 10 µg Vektor-DNA mittels Calciumphosphattransfektion transfiziert, nach 24 h mittels Metafectene® Pro mit 6 µg Plasmid nachtransfiziert und nach insgesamt 48 h analysiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Es wurden je 10 µL Zellysat aufgetragen. Die Proteine wurden mit dem Primärantikörper Rabbit anti-GFP in einem Verhältnis von 1:1000 detektiert. Dieser wurde wiederum mit dem Sekundärantikörper Goat anti-Rabbit IgG HRP-konjugiert in einem Verhältnis von 1:2000 detektiert.

Hierbei zeigte sich, dass alle FRET-Vektoren in HEK293T-, sowie in HeLa-Zellen, zur Expression der betrachteten Proteine führten. Für die Proteine SIV-Rev-CFP, HIV-1-Rev-CFP und HERVK-Rec-CFP wurden eine Banden bei ca. 40 kDa detektiert, für das Protein Staufen-1-YFP bei ca. 80 kDa, für das Protein Staufen-1-Mutante 1-YFP bei ca. 55 kDa und für das Protein Staufen-1-Mutante 2-YFP bei ca. 40 kDa. Auffällig war, dass das Protein HIV-1-Rev-CFP nur schwach exprimiert und stark abgebaut wurde.

3.1.1.1. Untersuchung der DNA-Konzentrationen der Konstrukte

Da im Western Blot das Protein HIV-1-Rev-CFP nur schwach nachgewiesen wurde, wurde zur Überprüfung der verwendeten Plasmid-DNA Konzentration eine Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.4) mit allen Konstrukten bei gleicher DNA-Konzentration durchgeführt (Abbildung 7).

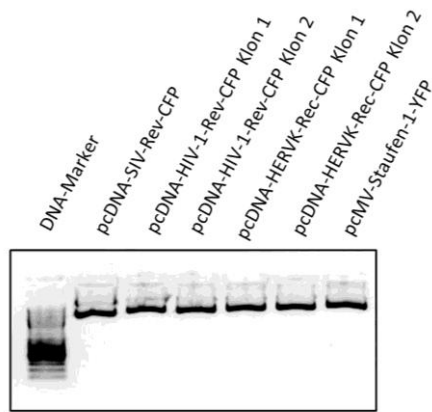


Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophorese zur Untersuchung der DNA-Konzentrationen der verschiedenen Konstrukte. 0,5 µg Plasmid-DNA wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und für 15 min bei einer Spannung von 90 V aufgetrennt.

Hierbei konnten keine abweichenden DNA-Konzentrationen bei den HIV-1-Rev-CFP-Vektoren festgestellt werden, was zeigt, dass die mittels NanoDrop-Bestimmung ermittelten Plasmid-DNA-Konzentrationen stimmen.

3.1.1.2. Untersuchung der Proteinexpression von HIV-1-Rev-CFP

Um die Proteinexpression von HIV-1-Rev-YFP genauer zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit 1-6 µg pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1 transfiziert (2.2.3.1.1), danach die Zelllysate hergestellt (2.2.3.2) und eine SDS-Page (2.2.3.3) mit anschließender Western Blot-Analyse (2.2.3.4) durchgeführt (Abbildung 8).

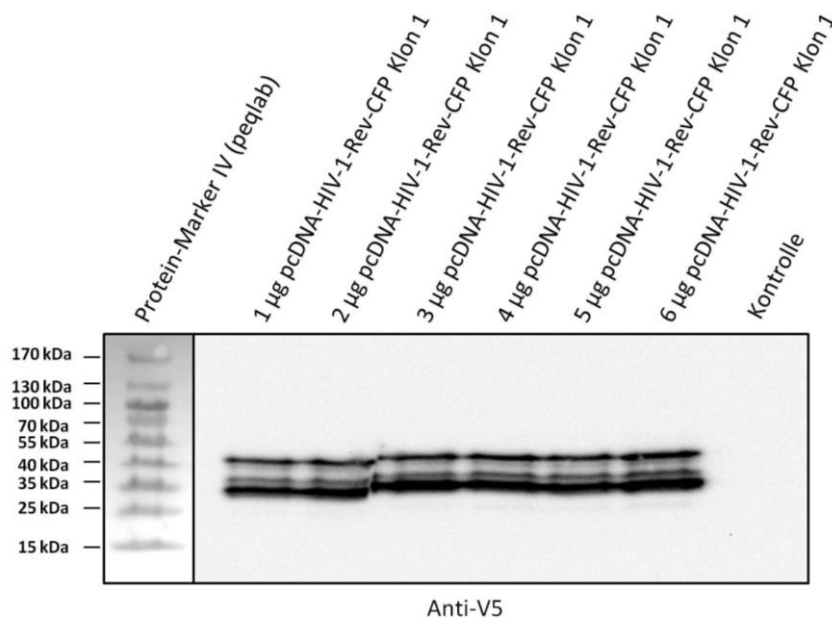


Abbildung 8: Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Proteinexpression mit unterschiedlicher Plasmid-DNA-Konzentration von pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1. HEK293T-Zellen wurden mit 1-6 µg pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1 transfiziert und nach 24 h analysiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Es wurden je 10 µL Zelllysate aufgetragen. Die Proteine wurden mit dem Primärantikörper Mouse anti-V5 in einem Verhältnis von 1:5000 detektiert. Dieser wurde wiederum mit dem Sekundärantikörper Rabbit anti-Mouse IgG HRP-konjugiert in einem Verhältnis von 1:2000 detektiert.

Es zeigte sich, dass das Protein HIV-1-Rev-CFP in den verwendeten Plasmid-DNA-Mengen gleich stark abgebaut wird, unabhängig davon mit wie viel Plasmid-DNA die Zellen transfiziert wurden. Der Abbau vom HIV-1-Rev-CFP-Protein resultiert also nicht aus einer zu hohen Menge an Plasmid-DNA bei der Transfektion.

3.1.2. Nachweis der Proteinexpression der Akzeptor- und Donor-Fluoreszenzproteine mittels cLSM

Zusätzlich wurde die Proteinexpression der Konstrukte mittels cLSM nachgewiesen. Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit 0,5 µg Vektor-DNA transfiziert (2.2.3.1.1), nach 15 Stunden fixiert (2.2.3.5) und anschließend Aufnahmen mit dem cLSM angefertigt (Abbildung 9, 2.2.3.5).

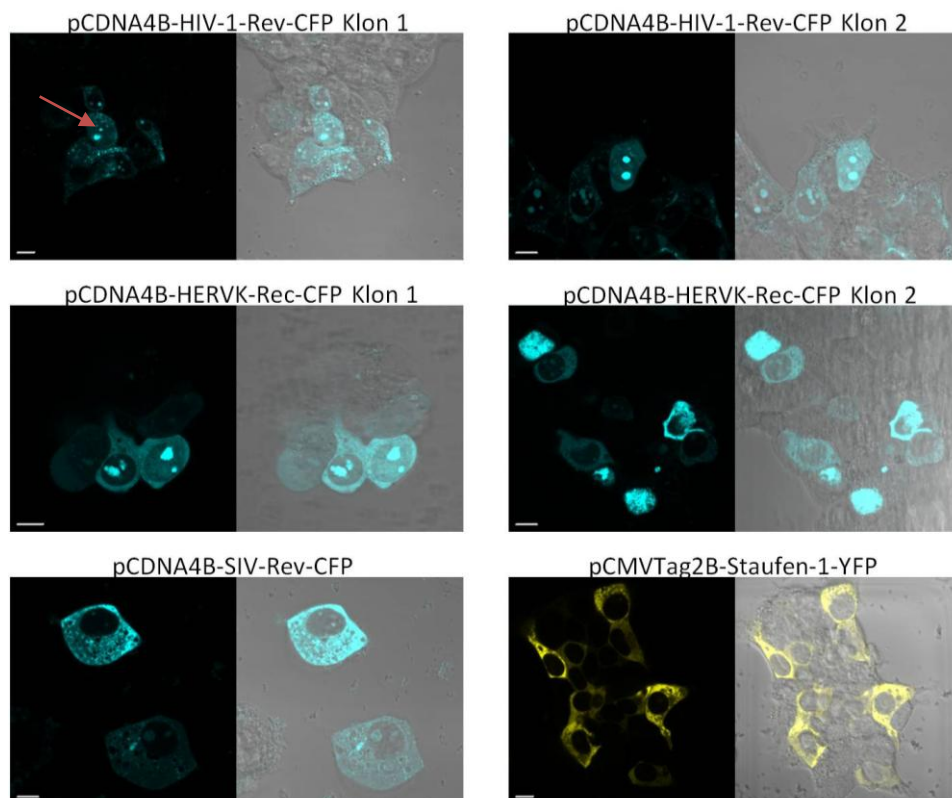


Abbildung 9: Konfokalmikroskopische Aufnahmen transfizierter Zellen mit FRET-Vektoren. HEK293T-Zellen wurden mit 0,5 µg Vektor-DNA transfiziert, nach 15 Stunden fixiert und analysiert. Das erste Bild jedes Konstruktes zeigt den CFP- bzw. YFP-Kanal und das zweite Bild die Überlagerung von YFP-, CFP- und Durchlicht-Kanal. Der rote Pfeil zeigt eine Granula an. Die Länge der Maßstabsbalken beträgt 10 µm.

Sichtbar wird hier, dass alle Konstrukte zur Expression von Fluoreszenzproteinen führen und die Fluoreszenz mittels cLSM detektiert werden kann. Es zeigte sich, dass die betrachteten Proteine vor allem im Cytoplasma lokalisiert sind und das Staufen-1-YFP-Protein nur sehr vereinzelt im Kern vorzufinden ist, wohingegen die Rec/Rev-Fusionsproteine auch im Kern zu verzeichnen sind. Darüber hinaus konnte eine unterschiedlich starke Ausprägung von Granula und Kernkörperchen bei den einzelnen Konstrukten beobachtet werden.

3.1.2.1. Analyse der Granula- bzw. Kernkörperchenformation

Bei der Konfokalmikroskopie der FRET-Konstrukte ist aufgefallen, dass die einzelnen Konstrukte unterschiedlich viele Granula bzw. Kernkörperchen pro Zelle aufweisen. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Granula bzw. Kernkörperchen in HEK293T-Zellen, die mit 0,5 µg Vektor-DNA der unterschiedlichen Konstrukte transfiziert wurden (2.2.3.1.1), ausgezählt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnisse der Granula/Kernkörperchen-Auszählung

Konstrukt	Zellen	Granula/Kernkörperchen	pro Zelle
pCDNA4B-SIV-Rev-CFP	74	68	0,92
pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1	56	83	1,48
pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 2	59	89	1,51
pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1	63	85	1,35
pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 2	85	121	1,42
pCMVTag2B-Staufen-1-YFP	163	17	0,10

Es zeigte sich, dass bei der Transfektion mit pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1, pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 2, pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1 und pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 2 durchschnittlich gleich viele Granula/Kernkörperchen pro Zelle gebildet werden und bei mit pCDNA4B-SIV-Rev-CFP transfizierten Zellen weniger Granula/Kernkörperchen gebildet werden als bei Transfektion mit den HIV-1-Rev-CFP- und HERVK-Rec-CFP-Konstrukten. Auffällig war, dass die Zellen, die mit pCMVTag2B-Staufen-1-YFP transfiziert wurden, so gut wie keine Granula/Kernkörperchen aufweisen.

3.2. FRET-Interaktionsanalyse

Um die Interaktion zwischen den Proteinen SIV-Rev-CFP, HIV-1-Rev-CFP und HERVK-Rec-CFP mit dem Staufen-1-YFP-Protein nachzuweisen, wurde die FRET-Methode der Akzeptor-Photobleichung (2.2.3.5) angewendet. Hierfür wurden Zellen nach dem Transfektionsschema (Tabelle 6) mit den Donor-Konstrukten und dem Akzeptor-Konstrukt kotransfiziert. Von den Zellen wurden mehrere Aufnahmen der Fluoreszenztintensität (I) im CFP- und YFP-Kanal angefertigt, bevor bestimmte Areale der Zelle (ROI, *regions of interest*) durch 100%ige Laserleistung des Argonlasers bei 514 nm gebleicht wurden (Abbildung 10A, Anhang (Abb.15A)). Die Bleichung wurde anschließend bei Aufnahme weiterer Fluoreszenzintensitäten wiederholt. Um positive FRET-Übergänge feststellen zu können, wurden die Fluoreszenzintensitätsprofile betrachtet (Abbildung 10B, Anhang (Abb.15B)).

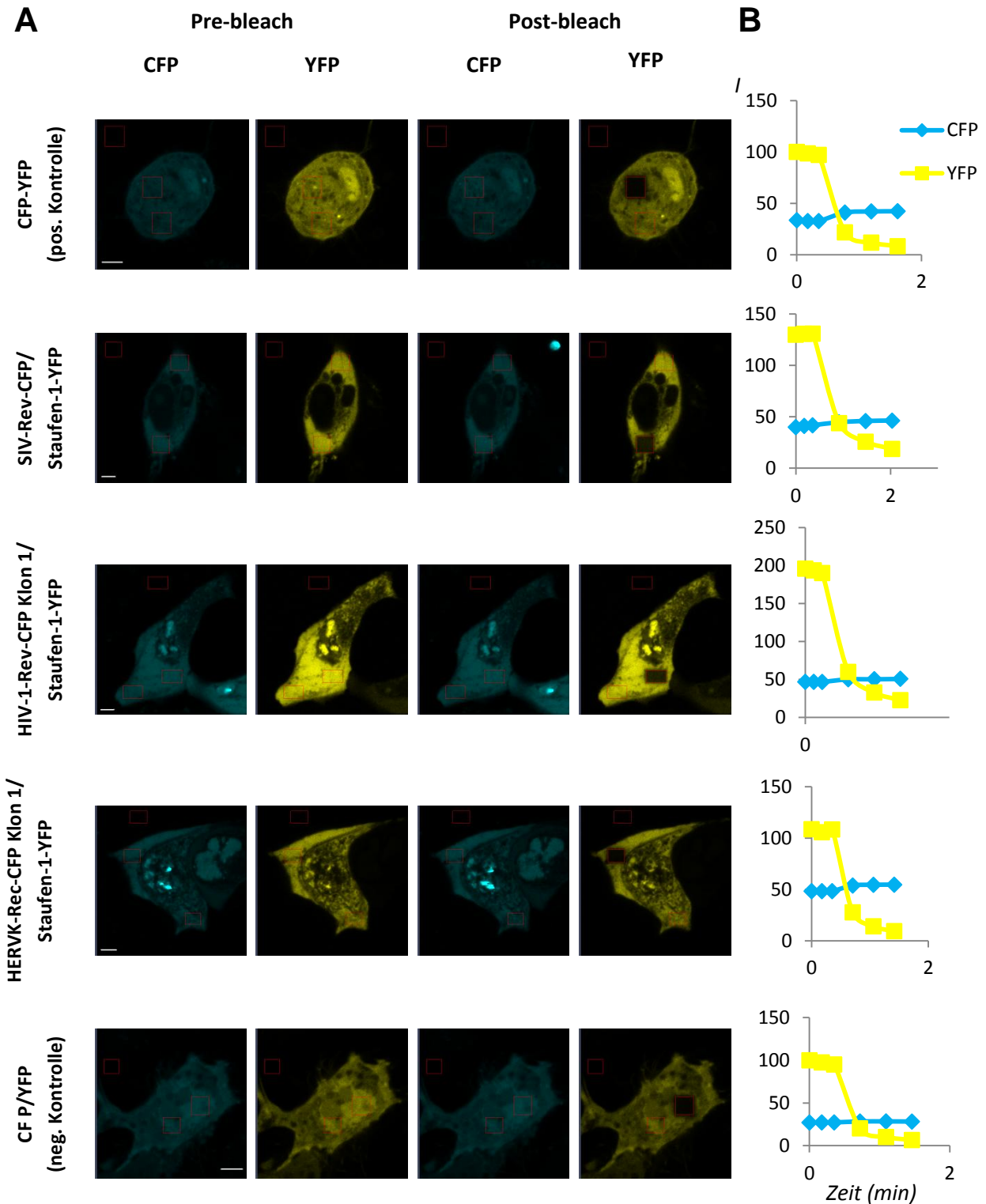


Abbildung 10: Ergebnisse der Akzeptor-Photobleichung- Experimente mit HeLa-Zellen. (A) HeLa-Zellen wurden mit pCDNA4B-SIV-Rev-CFP, pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1 bzw. pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1 und pCMVTag2B-Staufen-1-YFP kotransfiziert. Wobei, dass durch die Transfektion mit dem Staufen-1-YFP-Vektor exprimierte Staufen-1-YFP-Protein als Akzeptor dienen sollte und die durch die Transfektion mit Rev/Rec-Vektoren exprimierten Proteine als Donor dienten. Für die Positivkontrolle wurden HeLa-Zellen mit pECFP-YFP transfiziert und für die Negativkontrolle wurde mit pCDNA-CFP und pCDNA-YFP kotransfiziert. Die cLSM Aufnahmen wurden vor (*pre-bleach*) und nach der Photobleichung des Akzeptors (*post-bleach*) aufgenommen. Für die Photobleichung wurde die Laserleistung des Argonlasers bei 514 nm auf 100% eingestellt. Für jede Aufnahme wurden drei Bereiche (ROI, *regions of interest*) markiert, davon zwei innerhalb der Zelle und ein ROI außerhalb der Zelle. Gebleicht wurde die ROI außerhalb der Zelle und eine ROI innerhalb der Zelle. Die Länge der Maßstabsbalken beträgt 5 μ m. **(B)** Die Fluoreszenzintensität (I) des Donors (CFP-Kanal) und des Akzeptors (YFP-Kanal) wurden dreimal vor Photobleichung und dreimal während sich wiederholender Photobleichungen gemessen.

Das Fluoreszenzintensitätsprofil der Positivkontrolle (CFP mit YFP fusioniert) zeigte hierbei den typischen Kurvenverlauf, wie er bei einem positiven FRET-Übergang zu erwarten ist: zeitgleich mit der Bleichung, erkennbar am Abfall der Fluoreszenzintensität im YFP-Kanal, steigt die Fluoreszenzintensität des Donors (Anstieg im CFP-Kanal). Die Kotransfektionen von pCDNA4B-SIV-Rev-CFP, pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1 bzw. pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1 mit pCMVTag2B-Staufen-1-YFP zeigten ebenfalls den typischen Kurvenverlauf eines positiven FRET-Überganges. Bei Zellen, die mit pCDNA-CFP und pCDNA-YFP kotransfiziert wurden, konnte kein positiver FRET-Übergang beobachtet werden.

Des Weiteren wurde die FRET-Effizienz in % mit Hilfe des, in der Zeiss ZEN 2010 Software implementierten, FRET-Makros berechnet (Abbildung 11, Anhang (Tabelle 8 +9)).

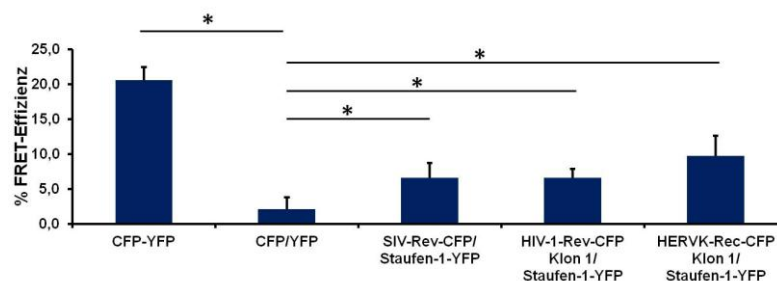


Abbildung 11: Ergebnisse der FRET-Effizienzbestimmung. Zur Berechnung der FRET-Effizienz wurden einzelne mit pECFP-YFP (n = 5), pCDNA-CFP/pCDNA-YFP (n = 6), pCDNA4B-SIV-Rev-CFP/pCMVTag2B-Staufen-1-YFP (n = 5), pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1/pCMVTag2B-Staufen-1-YFP (n = 6) bzw. pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1/pCMVTag2B-Staufen-1-YFP (n = 6) kotransfizierte HeLa-Zellen verwendet. Die Säulen im Diagramm entsprechen den berechneten Mittelwerten und die T-Balken geben die Standardabweichung an. * p < 0,05

Hierbei konnten bei der Kotransfektion von pCDNA-CFP mit pCDNA-YFP (Negativkontrolle) keine hohen FRET-Effizienzwerte gemessen werden. Die Positivkontrolle (Expression des Fusionsproteins CFP-YFP) verzeichnet jedoch hohe FRET-Effizienzwerte. Bei den Kotransfektionen von pCDNA4B-SIV-Rev-CFP, pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1 bzw. pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1 mit pCMVTag2B-Staufen-1-YFP konnten ebenfalls hohe FRET-Effizienzwerte festgestellt werden, die sich signifikant von der Negativkontrolle, aber nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.2.1. Interaktionsanalyse mit der Staufen-ΔRBD4,5-Mutante

Als weiteres Experiment wurde eine FRET-Analyse mit der Staufen-1-Verkürzungsmutante 2 durchgeführt (2.2.3.5). Diese Mutante soll aufgrund des Fehlens der RBD4 und RBD5 als biologische Negativkontrolle dienen. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit den Donor-Konstrukten und dem Staufen-1-Mutante 2-YFP-Konstrukt nach dem Transfektionsschema (Tabelle 6) kotransfiziert und nachfolgend die PPI mittels der FRET-Methode der Akzeptor-Photobleichung analysiert (Abbildung 12).

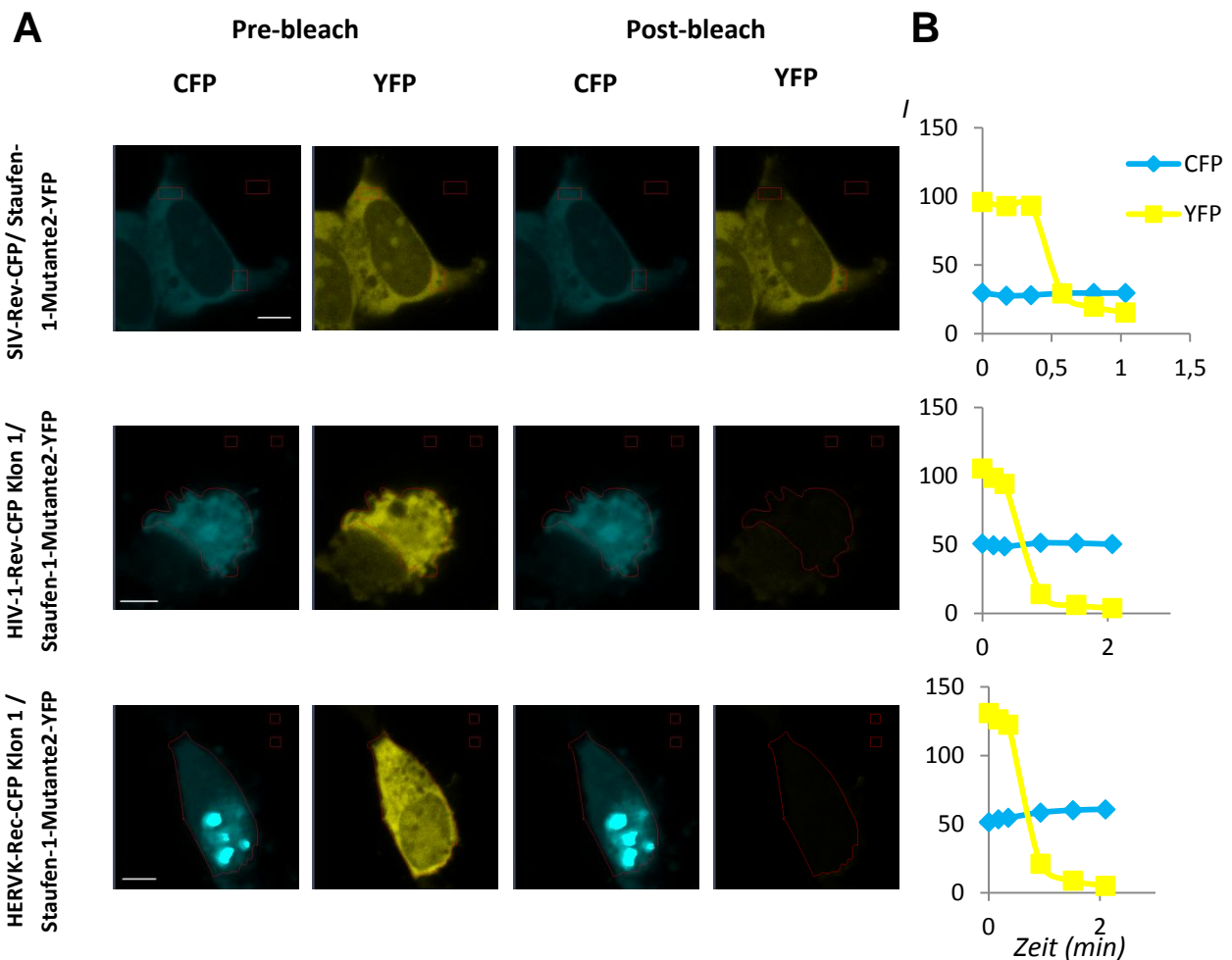


Abbildung 12: Ergebnisse der Akzeptor-Photobleichung-Experimente mit der Staufen-1-Verkürzungsmutante 2. (A) HEK293T-Zellen wurden mit den Donor-Konstrukten und dem Staufen-1-Mutante 2-YFP-Konstrukt als Akzeptor kotransfiziert. Die cLSM Aufnahmen wurden vor (*pre-bleach*) und nach der Photobleichung des Akzeptors (*post-bleach*) aufgenommen. Für die Photobleichung wurde die Laserleistung des Argonlasers bei 514 nm auf 100% eingestellt. Es wurden je Aufnahme drei Bereiche (ROI, *regions of interest*) markiert. Davon ein bis zwei innerhalb der Zelle und ein bis zwei ROI außerhalb der Zelle. Gebleicht wurde eine ROI außerhalb der Zelle und eine ROI innerhalb der Zelle. Die Länge der Maßstabsbalken beträgt 5µm. (B) Die Fluoreszenzintensität (I) des Donors (CFP-Kanal) und des Akzeptors (YFP-Kanal) wurden mehrmals vor Photobleichung und während sich wiederholender Photobleichungen gemessen.

Das Ergebnis dieses Experimentes wich von der Erwartung, keine positiven FRET-Übergänge beobachten zu können, ab. Es konnten ebenso, wie bei der Kotransfektion der Rev/Rec-Konstrukte mit dem Vektor für das Staufen-1-Vollängenprotein, positive FRET-Übergänge beobachtet werden. Jedoch waren die FRET-Übergänge schwächer ausgeprägt.

3.2.1.1. Kolokalisationsanalyse der Staufen-1- Δ RB4,5-Mutante mit den Rev/Rec-Konstrukten

Um das Ergebnis der Interaktionsanalyse mit der Staufen-1-Verkürzungsmutante 2 zu bestärken, wurde eine Kolokalisationsanalyse mit dem Protein Staufen-1-Mutante 2-YFP und den Rev/Rec-Proteinen in, mit den entsprechenden Vektoren kotransfizierten, HeLa-Zellen durchgeführt (Abbildung 13).

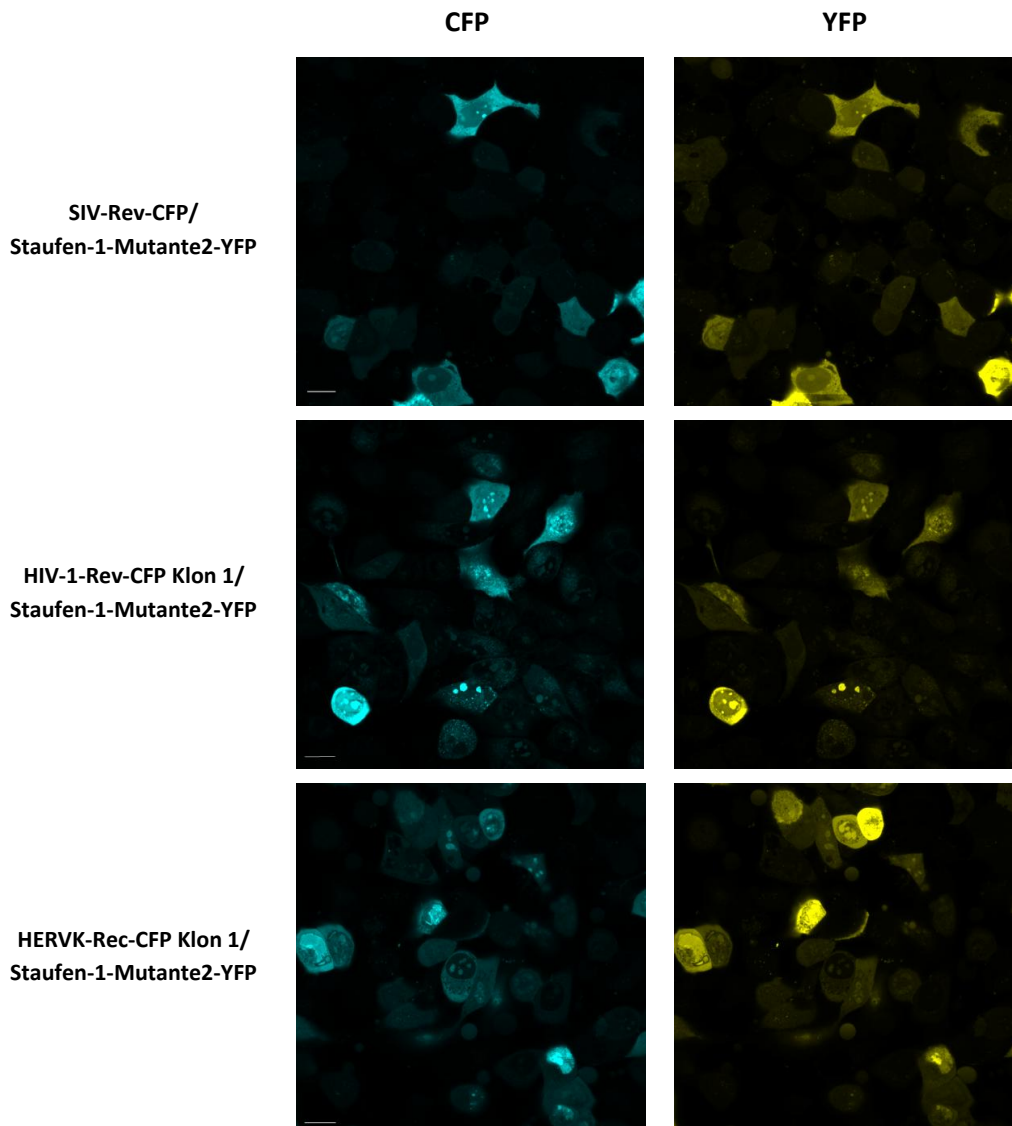


Abbildung 13: Ergebnisse der Kollisionsanalyse der Staufen-1-Verkürzungsmutante 2 mit den Rev/Rec-Konstrukten. HeLa-Zellen wurden mit pCDNA4B-SIV-Rev-CFP, pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1 bzw. pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1 und pCMV-Staufen-1-Mutante 2-YFP kotransfiziert nach 24 Stunden fixiert und anschließend Übersichtsaufnahmen des YFP und CFP-Kanals mit dem cLSM aufgenommen. Die Länge der Maßstabsbalken beträgt 20 µm.

Anhand der konfokalmikroskopischen Übersichtsaufnahmen ist klar zu erkennen, dass die exprimierten Rev/Rec-Proteine in den gleichen Arealen der Zelle vorkommen, wie das exprimierte Staufen-1-Mutante 2-YFP-Protein. Diese stark ausgeprägte Kollisionsanalyse bestärkt die Vermutung, dass das Protein der Staufen-1-Verkürzungsmutante 2 mit Rev bzw. Rec interagiert.

3.3. Interaktionsanalyse mittels PLA-Analyse

Um die Interaktion der Proteine SIV-Rev-CFP, HIV-1-Rev-CFP Klon1 und HERVK-Rec-CFP Klon 1 mit dem Staufen-1-YFP-Protein mit einer weiteren Methode zu überprüfen, wurde eine PLA-Analyse durchgeführt (2.2.3.6). Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit den Rev/Rec-Konstrukten und pCMVTag2B-Staufen-1-YFP kotransfiziert, eines PLA unterzogen und nachfolgend die PLA-Signale durch cLSM-Aufnahmen erfasst (Abbildung 14A) und ausgewertet (Abbildung 14B, Anhang (Tabelle 10+11)).

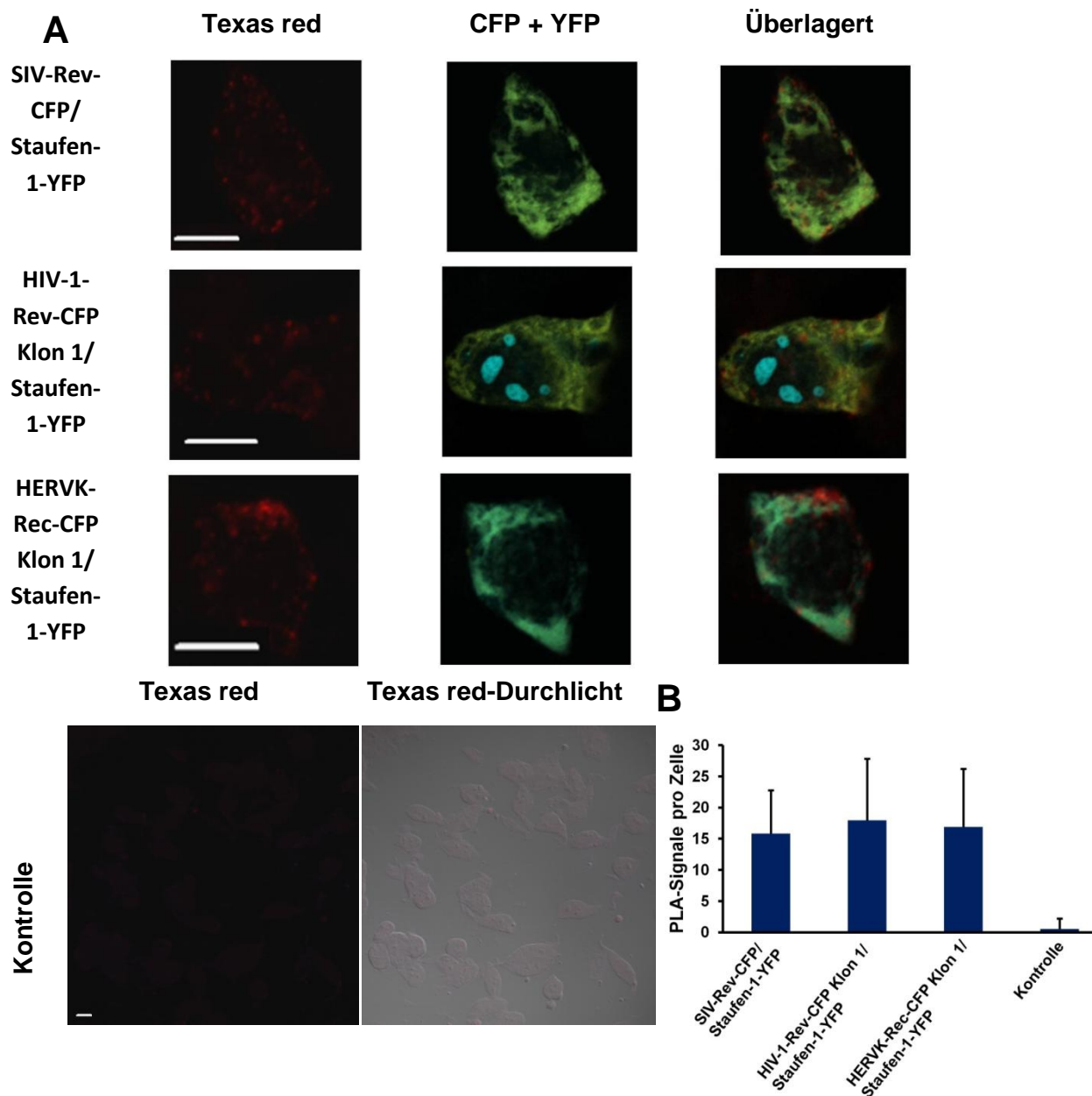


Abbildung 14: Ergebnisse der PLA-Analyse. (A) HEK293T-Zellen wurden mit pCDNA4B-SIV-Rev-CFP, pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1 bzw. pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1 mit pCMVTag2B-Staufen-1-YFP kotransfiziert. Die exprimierten Rev- bzw. Rec-Fusionsproteine wurden mit den Primärantikörpern Anti-V5 (5 µg/ml) markiert und das Staufen-1-YFP-Protein mit dem Primärantikörper Anti-FLAG (5 µg/ml). Die Primärantikörper wurden mit den konjugierten Sekundärantikörpern anti-Mouse PLUS bzw. anti-Goat MINUS detektiert und durch anschließende Ligation, Amplifikation und FISH mit fluoreszierenden Sonden (Texas red) nachgewiesen. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Die Länge der Maßstabsbalken beträgt 10 µm. **(B)** Zur Analyse der PLA-Signale pro Zelle wurden einzelne, mit pCDNA4B-SIV-Rev-CFP/pCMVTag2B-Staufen-1-YFP (n = 39), pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1/pCMVTag2B-Staufen-1-YFP (n = 38) bzw. pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1/pCMVTag2B-Staufen-1-YFP (n = 37) kotransfizierte, HEK293T-Zellen ausgewertet. Die Säulen im Diagramm entsprechen den berechneten Mittelwerten und die T-Balken geben die Standardabweichung an. Die Mittelwerte der Proben weichen alle signifikant vom Mittelwert der untransfizierten Zellen ab ($p < 0,05$), aber unterschieden nicht signifikant voneinander.

Es konnten in den Proben PLA-Signale detektiert werden, die sich in ihrer Anzahl signifikant von der Kontrolle mit untransfizierten Zellen, in der keine signifikante Anzahl von PLA-Signalen vermerkt wurde, unterscheiden. Die PLA-Analyse konnte demnach die PPI zwischen den Proteinen SIV-Rev-CFP, HIV-1-Rev-CFP Klon1 bzw. HERVK-Rec-CFP Klon 1 und Staufen-1-YFP-Protein bestätigen.

4. Diskussion

Retroviren besitzen ein relativ kleines Genom und codieren nur für wenige Proteine. Daher sind die auf Interaktionen mit Wirtsproteinen angewiesen und machen sich diese für ihre Replikation zu Nutze. Für einige Retroviren sind diese Interaktionen sogar essentiell (Chatel-Chaix et al., 2004; Fruh et al., 2010). Die Erforschung solcher Protein-Protein-Interaktionen (PPI) steht im Vordergrund, da sie auch vielversprechende Angriffsziele für die antivirale Therapie darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die bereits mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System und Koimmunopräzipitation identifizierte Interaktion zwischen dem Protein Rec aus dem human endogene Retrovirus K (HERVK) und dem humanen Protein Staufen-1 mit einer weiteren Methode bestätigt und die Interaktion des Proteins Rev aus dem humanen Immundefizienz- Virus 1 (HIV-1) bzw. dem simianen Immundefizienz-Virus (SIV) mit dem humanen Protein Staufen-1 nachgewiesen werden (Hanke et al., 2013b). Hierfür wurde eine Förster/Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-Analyse durchgeführt. Zusätzlich wurden die Interaktionen mittels *proximity ligation assay* (PLA)-Analyse bestätigt und Voruntersuchungen mit einer Staufen-1-Verkürzungsmutante durchgeführt.

4.1. Analyse der PPI von HIV-1-Rev, SIV-Rev und HERVK-Rec mit Staufen-1 mittels FRET-Analyse

Mittels FRET-Analyse können PPI zuverlässig nachgewiesen werden (Fernandez and Berlin, 1976). Die für den Rahmen dieser Arbeit geeignetste FRET-Methode stellte hierbei die Methode der Photobleichung des Akzeptors dar (Piston and Kremers, 2007). Bei dieser Methode wird der Akzeptor irreversibel zerstört. Ist nach der Zerstörung des Akzeptors eine Erhöhung der Donorfluoreszenz zu verzeichnen, spricht man von einem positiven FRET-Übergang (Kenworthy, 2001). Dieser ist ein deutlicher Hinweis auf eine Interaktion zwischen den Donor- und Akzeptorproteinen. Um die Interaktion zwischen den Rev/Rec-Protein und dem Staufen-1-Protein bestimmen zu können, wurden Fusionsproteine aus Rev/Rec und SCFP (*super cyan fluorescent protein*) als Donor und ein Fusionsprotein aus Staufen-1 und SYFP (*super yellow fluorescent protein*) als Akzeptor verwendet. Hierfür wurden HEK293T-Zellen und HeLa-Zellen mit den entsprechenden Vektor-Plasmiden kotransfiziert und anschließend mittels konfokaler Laser-Mikroskopie (cLSM) eine FRET-Analyse durchgeführt (3.2). Es konnten positive FRET-Übergänge nachgewiesen werden, was auf eine Interaktion zwischen dem humanen Protein Staufen-1 und dem Protein Rev aus HIV-1 und SIV sowie dem Protein Rev aus HERV-K hindeutet (Abbildung 10, Anhang (Abb. 15)). Auch wenn die ermittelten FRET-Effizienzen (Abbildung 11) nicht sehr hoch sind, bekräftigen sie die Vermutung einer Interaktion zwischen den Proteinen Staufen-1 und Rev/Rec. Die angewandte Methode der FRET-Analyse wird auch nie eine FRET-Effizienz von 100 % erreichen können, da dies technisch nicht möglich ist. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Fusionsprotein CFP-YFP, welches als Positivkontrolle eingesetzt wurde, ermittelt welche FRET-Effizienzwerte technisch maximal gemessen werden können. Außerdem muss man berücksichtigen, dass, wie bei den Western Blot-Analysen zu erkennen war, die Fusionsproteine zerfielen (Abbildung 5 + 6). Dies wirkte sich negativ auf die Höhe der gemessenen FRET-Effizienzwerte aus. So würde z.B. die gemessene FRET-Effizienz von 6,6 % für HIV-1-Rev-CFP/Staufen-1-YFP (Anhang (Tabelle 8)) eigentlich bei ca. 13 % liegen, wenn man davon ausgehen würde, dass 50 % der Proteine abgebaut wurden.

Da technisch eine maximale FRET-Effizienz von 20,5 % ermittelt wurde, würden 13 % einer starken Interaktion entsprechen. Um jedoch die tatsächliche Stärke der Interaktion bestimmen zu können, sind FRET-Messungen in einem größeren Rahmen notwendig. Es müssten also noch mehr FRET-Messungen durchgeführt werden, um größere Datenmengen zu erhalten. Hierfür wäre es von Vorteil nach einer Möglichkeit zu suchen, die den Abbau der Proteine stoppt, damit die tatsächliche Stärke der Interaktion bestimmt werden könnte. Während der Betrachtung der kotransfizierten Zellen für die FRET-Analyse fiel auf, dass das Staufen-1-Protein in Anwesenheit des Rev-/Rec-Proteins im Nukleus vorzufinden war. Bei der Betrachtung der Proteinexpression der einzelnen Konstrukte war aufgefallen, dass das Protein Staufen-1 vornehmlich im Cytoplasma lokalisiert ist und die Rev-/Rec-Proteine im Cytoplasma sowie im Nukleus vorzufinden waren (3.1.2, 3.1.2.1). Dies ist auch schon bei früheren Experimenten mit den Proteinen Staufen-1 und Rec aufgefallen (Hanke et al., 2013b). Das Nichtvorhandensein des Staufen-1-Proteins im Nukleus wurde dabei auf den starken nukleären Export und starker Zurückbehaltung vom Staufen-1-Protein im Cytoplasma zurückgeführt, und das Vorhandensein des Staufen-1-Proteins im Nukleus bei Kotransfektion mit dem Rec-Protein durch eine Störung des nukleären Exports durch das Rec-Protein erklärt. Durch weitere FRET-Messungen könnte bestimmt werden, ob es einen Unterschied in der Stärke der Interaktion von Staufen-1 und Rev bzw. Rec im Cytoplasma und im Nukleus gibt.

4.2. Analyse der PPI von HIV-1-Rev, SIV-Rev und HERVK-Rec mit Staufen-1 mittels PLA-Analyse

Die PLA-Analyse ist eine weitere Methode zum Nachweis von PPI (Weibrecht et al., 2010). Das PLA-Signal resultiert aus einer Rolling-Circle-Amplifikation-Reaktion, die mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit fluoreszierenden Sonden nachgewiesen wird. Hierfür werden die betrachteten Proteine erst mit Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies markiert und diese wiederum von spezifischen Sekundärantikörpern erkannt. Die Sekundärantikörper sind mit Oligonukleotiden konjugiert, welche, wenn die betrachteten Proteine engster Umgebung lokalisiert sind, ligiert werden können und dann in der Rolling-Circle-Amplifikation amplifiziert werden. Um die Interaktion der Proteine SIV-Rev, HIV-1-Rev und HERVK-Rec mit dem Staufen-1-Protein mittels PLA-Analyse nachweisen zu können, wurden Zellen mit den entsprechenden Vektoren kotransfiziert. Wobei die Rev-/Rec-Proteine C-terminal je einen V5-Tag besaßen und das Staufen-1-Protein N-terminal einen FLAG-Tag besaß. Die Ergebnisse der PLA-Analyse bekräftigen, trotz starker Schwankungen in der Anzahl der PLA-Signale, die Vermutung einer Interaktion zwischen dem Protein Staufen-1 und dem Rec- bzw. Rev-Protein (3.3). In der Kontrolle konnten nur einige wenige unspezifische PLA-Signale detektiert werden. Nur bei Koexpression der Proteine Staufen-1 und Rev/Rec konnte eine signifikante Anzahl an PLA-Signalen beobachtet werden. Für zukünftige PLA-Analysen könnte die Betrachtung von unspezifischen PLA-Signalen in der transfizierten Zellkultur bei Zellen, die keine Koexpression zeigen, helfen, die PLA-Analyse weiter zu spezifizieren.

4.3. Analyse der PPI von HIV-1-Rev, SIV-Rev und HERVK-Rec mit Staufen-1- Δ RBD4,5- Verkürzungsmutante mittels FRET-Analyse

Das Protein Staufen-1 besitzt mehrere Domänen mit denen es Wechselwirkungen mit verschiedenen Proteinen eingehen kann (Chatel-Chaix et al., 2004; Hanke et al., 2013b; Mouland et al., 2000). Um zu erforschen mit welcher Domäne Staufen-1-Protein mit dem betrachteten Protein interagiert und inwiefern das Fehlen bestimmter Domänen die Interaktion beeinflusst, verwendet man Verkürzungsmutanten und analysiert deren Interaktion mit dem betrachteten Protein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Staufen-1-Verkürzungsmutante kloniert, der zwei dsRNA-Bindedomänen (RBD4 und RBD5) fehlen, (Staufen-1-Mutante2-YFP) und mit dieser FRET-Analysen durchgeführt (3.2.1). Hierbei konnten wie bei der FRET-Analyse mit den Rev/Rec-Proteinen und dem Staufen-1-Volllängenprotein positive FRET-Übergänge beobachtet werden, die auf eine Interaktion zwischen den Proteinen Rev/Rec und Staufen-1- Δ RBD4,5 hindeuten (Abbildung 12). Jedoch waren die FRET-Übergänge schwächer ausgeprägt als bei der Kotransfektion mit pCMVTag2B-Staufen-1-YFP. Um die Vermutung einer Interaktion zu bestärken, wurde eine Kolokalisationsanalyse durchgeführt (3.2.1.1). Hierfür wurden Zellen mit den Rev/Rec-Konstrukten und dem Staufen-1-Mutante 2-YFP-Vektor kotransfiziert und die Expression der Proteine im Anschluss mittels cLSM betrachtet. Hierbei fiel eine stark ausgeprägte Kolokalisation des Proteins Rev bzw. Rec mit dem Protein Staufen-1- Δ RBD4,5 auf (Abbildung 13). Besonders gut ist diese Kolokalisation bei den Granula bzw. Kernkörperchen im Nukleus zu erkennen. Die Kolokalisationsanalyse konnte somit die Vermutung einer Interaktion zwischen dem Rev-/Rec-Protein und dem Protein Staufen-1- Δ RBD4,5 bestärken. Widersprüchlich ist hierbei, dass bereits in Experimenten mit Staufen-1-Verkürzungsmutanten und HERVK-Rec mittels Pulldown-Assay die RBD4 als essentielle Stelle für die Bindung des Proteins Rec und dem Staufen-1-Protein identifiziert wurde (Hanke et al., 2013b). Somit hätte bei der FRET-Analyse von HERVK-Rec-CFP/Staufen-1-Mutante2-YFP kein FRET-Übergang zu sehen sein dürfen. Da aber humane Proteine zu 80 % in assoziierten Proteinkomplexen agieren (Berggard et al., 2007), liegt die Vermutung nahe, dass an der Interaktion zwischen dem Protein Staufen-1 und dem Protein Rec weitere Proteine beteiligt sind. Vermutlich gibt es eine schwache N-terminale Interaktion zwischen dem Staufen-1-Protein und dem HERVK-Rec-Protein, die über ein Adapterprotein oder einen Proteinkomplex vermittelt wird. Für diese Vermutung spricht, dass die beobachteten FRET-Übergänge bei der FRET-Analyse mit der Verkürzungsmutante schwächer waren als bei der FRET-Analyse mit dem Staufen-1-Volllängenprotein. Aufgrund der geringen Stärke dieser Interaktion wurde sie vermutlich durch die beim Pulldown-Assay verwendeten Detergenzien zerstört. Die C-terminale Interaktion zwischen dem Staufen-1-Protein und dem Rec-Protein scheint stärker ausgeprägt zu sein und somit mittels Pulldown-Assay nachweisbar zu sein. Für das HIV-Rev-Protein gibt es ebenfalls die Vermutung, dass mehr als ein Faktor am RNA-Export beteiligt ist (Fischer et al., 1994). Um die Interaktion zwischen dem Staufen-1-Protein und dem Rec-Protein genauer zu untersuchen, sind weitere Experimente mit Verkürzungsmutanten notwendig. Ebenfalls könnte es von Interesse sein, mögliche Interaktionspartner zu finden, die an der Bindung des Rec-Proteins an das Protein Staufen-1 beteiligt sind und ihre Bedeutung zu erforschen.

5. Zusammenfassung

Da Retroviren nur für wenige Proteine codieren, sind sie stark auf die Interaktion mit Wirtsproteinen angewiesen. Diese Wirt-Pathogen Interaktionen basieren auf Protein-Protein-Interaktionen (PPI). Für einige Retroviren sind diese Interaktionen für die Replikation des Virus essentiell. PPIs bieten somit gute Angriffsziele für antivirale Therapien. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von dem humanen Protein Staufen-1 mit dem Protein Rev aus dem siamen (SIV) und humanen Immunodefizienz-Virus 1 (HIV-1) und mit Rec aus dem humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K) mittels Fluoreszenz (Förster)- Resonanz-Energie-Transfer (FRET)- Analyse und *proximity ligation assay* (PLA) nachgewiesen. FRET basiert auf der Annahme, dass Energie optisch angeregter Moleküle beim Zusammentreffen mit anderen Molekülen strahlungsfrei übertragen wird. Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten FRET-Methode der Photobleichung des Akzeptors wird der Akzeptor (Staufen-1-YFP) zerstört. Dies führt, wenn sich Donor und Akzeptor in unmittelbarer Nähe befinden, zu einer Zunahme der Donorfluoreszenzintensität, da der Energietransfer zum Akzeptor reduziert wurde. Um dies beobachten zu können und somit die Vermutung einer Interaktion zwischen Donor und Akzeptor aufstellen zu können, wurden die Fluoreszenzintensitäten des Donors und Akzeptors vor und nach der Photobleichung gemessen. Bei der PLA-Analyse werden die betrachteten Proteine mittels mit Oligonukleotiden konjugierten Antikörpern detektiert. Befinden sich die betrachteten Proteine in unmittelbarer Nähe, so können die Oligonukleotide mittels einer Ligation ligiert werden und anschließend in einer Rolling-Circle-Amplifikation-Reaktion amplifiziert werden. Die amplifizierte zirkuläre DNA kann dann mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit fluoreszierenden Sonden nachgewiesen werden. SIV ist der Vorläufer von HIV. Ihre Morphologie und ihr Genomaufbau sind daher nahezu identisch. HIV-1 ist Ursache für das erworbene Immundefektsyndrom (AIDS). Im Gegensatz zu HIV lösten die SIV-Stämme in der für sie spezifischen Affenart jedoch keine Krankheitssymptome aus. Wenn jedoch ein SIV-Stamm eine für ihn nicht spezifische Affenart infiziert, können AIDS-ähnliche Symptome auftreten. Daher wird SIV zur Erforschung von HIV und AIDS eingesetzt. Das von HIV-1 und SIV exprimierte Protein Rev ist zuständig für den Transport ungespleißter RNAs vom Nukleus ins Cytoplasma und an der cytoplasmatische Expression der Strukturproteine beteiligt. Es ist für die Replikation des HI/SI-Virus essentiell. HERV-K ist im Genom des Menschen integriert und kann Virus-ähnliche Partikel produzieren. Wie auch HIV-1 und SIV codiert es für einen RNA-Transport-Protein. Dieser wird Rec bezeichnet, ist Rev aber nahezu identisch. HERV-K hat im Laufe der Zeit seine Infektiosität verloren, steht jedoch in Verdacht, bei der Entwicklung von Tumoren beteiligt zu sein. Hierbei gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von Rec und der Entstehung von Keimzelltumoren. Staufen-1 ist ebenfalls ein RNA-Transport-Protein. Es besitzt vier dsRNA-Bindedomänen (RBD2 bis RBD5) und eine Tubulin-Bindedomäne (TBD). Es interagiert über seine Domänen mit Rev/Rec und trägt zur Replikation der Viren bei. Durch die FRET-Analyse mit einer Staufen-1-Verkürzungsmutante, der RBD4 und RBD5 fehlt, konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass diese Domänen für die Interaktion von Staufen-1 und Rev bzw. Rec nicht essentiell sind. Es konnten trotz des Fehlens dieser Domänen positive FRET-Übergänge beobachtet werden. Um die Interaktion zwischen Staufen-1 und Rev bzw. Rec genauer zu untersuchen, sind weitere Experimente mit Verkürzungsmutanten nötig. Ebenfalls könnten weitere FRET-Analysen aufklären, ob es Unterschiede in der Stärke der Interaktion von SIV-Rev, HIV-1-Rev und HERVK-Rec mit Staufen-1 gibt und, ob sich die Stärke der Interaktion zwischen Nukleus und Cytoplasma unterscheidet.

Anhang

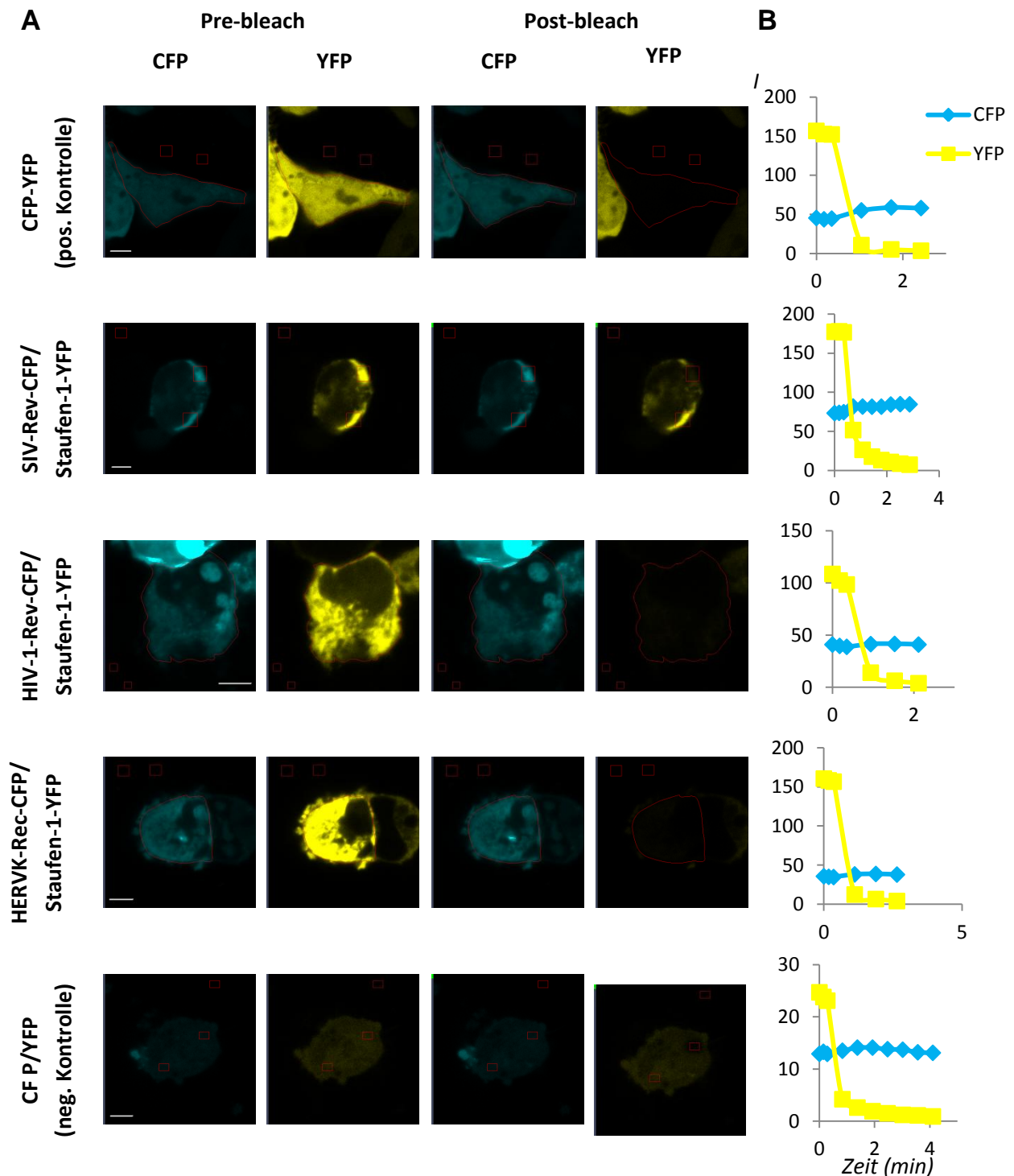


Abbildung 15: Ergebnisse der Akzeptor-Photobleichung- Experimente mit HEK293T-Zellen. (A) HEK293T-Zellen wurden mit pCDNA4B-SIV-Rev-CFP, pCDNA4B-HIV-1-Rev-CFP Klon 1 bzw. pCDNA4B-HERVK-Rec-CFP Klon 1 und pCMVTag2B-Staufen-1-YFP kotransfiziert. Wobei, dass durch die Transfektion mit dem Staufen-1-YFP-Vektor exprimierte Staufen-1-YFP-Protein als Akzeptor dienen sollte und die durch die Transfektion mit Rev/Rec-Vektoren exprimierten Proteine als Donor dienen. Für die Positivkontrolle wurden HeLa-Zellen mit pECFP-YFP transfiziert und für die Negativkontrolle wurde mit pCDNA-CFP und pCDNA-YFP kotransfiziert. Die cLSM Aufnahmen wurden vor (*pre-bleach*) und nach der Photobleichung des Akzeptors (*post-bleach*) aufgenommen. Für die Photobleichung wurde die Laserleistung des Argonlasers bei 514 nm auf 100% eingestellt. Es wurden je Aufnahme drei Bereiche (ROI, *regions of interest*) markiert. Davon ein bis zwei innerhalb der Zelle und ein bis zwei ROI außerhalb der Zelle. Gebleicht wurde eine ROI außerhalb der Zelle und eine ROI innerhalb der Zelle. Die Länge der Maßstabsbalken beträgt 5µm. (B) Die Fluoreszenzintensität (I) des Donors (CFP-Kanal) und des Akzeptors (YFP-Kanal) wurden mehrmals vor Photobleichung und während sich wiederholender Photobleichungen gemessen.

Tabelle 8: Rohdaten der FRET-Effizienzbestimmung

	FRET-Effizienz (%)				
	CFP-YFP	CFP/YFP	SIV-Rev-CFP / Staufen-1-YFP	HIV-Rev-CFP Klon 1 / Staufen-1-YFP	HERVK-Rec-CFP Klon 1 / Staufen-1-YFP
	22,5	3,0	9,7	7,8	8,6
	20,0	3,8	4,3	4,3	6,6
	22,6	3,7	6,2	6,2	11,5
	18,47	1,7	5,4	5,4	13,6
	19,16	0,46	7,4	7,4	11,0
		-0,33			7,0
Mittelwert	20,5	2,1	6,6	6,6	9,8
Standardabweichung	1,9	1,7	2,1	1,2	2,9

Tabelle 9: Signifikanzwerte der FRET-Effizienzbestimmung

Proben	p-value
CFP-YFP → CFP/YFP	0,00001
CFP/YFP → SIV-Rev-CFP/Staufen-1-YFP	0,03
CFP/YFP → HIV-1-Rev-CFP Klon 1/Staufen-1-YFP	0,006
CFP/YFP → HERVK-Rec-CFP Klon 1/Staufen-1-YFP	0,002
SIV-Rev-CFP/Staufen-1-YFP → HIV-1-Rev-CFP Klon 1/Staufen-1-YFP	1,0
HERVK-Rec-CFP Klon 1/Staufen-1-YFP → SIV-Rev-CFP/Staufen-1-YFP	0,08
HIV-1-Rev-CFP Klon 1/Staufen-1-YFP → HERVK-Rec-CFP Klon 1/Staufen-1-YFP	0,05

Tabelle 10: Rohdaten der PLA-Analyse

	Anzahl PLA-Signale pro Zelle			
	Kontrolle	SIV-Rev-CFP	HIV-1-Rev-CFP Klon 1	HERVK-Rec-CFP Klon 1
	0	14	21	10
	0	25	8	7
	0	9	35	4
	0	12	7	21
	3	7	46	13
	0	14	28	6
	0	11	16	7
	0	8	15	14
	0	15	11	10
	0	17	9	8
	2	8	15	6
	0	6	6	14
	0	7	31	6
	1	10	20	14
	0	12	22	12
	0	9	22	7
	0	17	8	22

	0	12	10	6
	0	19	16	18
	0	20	21	25
	9	20	44	23
	0	15	18	39
	0	11	19	28
	0	18	18	22
	0	15	19	14
	0	16	38	16
	0	13	7	25
	0	14	16	12
	0	13	12	14
	0	21	10	23
	0	24	10	41
	0	25	17	28
	0	26	18	15
	0	25	11	17
	2	34	17	24
	0	13	9	30
	0	7	18	25
	4	28	15	
	0	28		
Mittelwert	0,5	15,8	18,0	17,0
Standardabweichung	1,7	6,9	9,8	9,3

Tabelle 11: Signifikanzwerte der PLA-Analyse

Proben	p-value
Kontrolle → SIV-Rev-CFP	0,0000000000000002
Kontrolle → HIV-1-Rev-CFP Klon 1	0,000000000000005
Kontrolle → HERVK-Rec-CFP Klon 1	0,00000000000009
HIV-1-Rev-CFP Klon 1 → SIV-Rev-CFP	0,3
HERVK-Rec-CFP Klon 1 → HIV-1-Rev-CFP Klon 1	0,6
SIV-Rev-CFP → HERVK-Rec-CFP Klon 1	0,3

Literaturverzeichnis

Aboul-ela, F., Karn, J., and Varani, G. (1995). The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein. *Journal of molecular biology* 253, 313-332.

Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211.

Baner, J., Nilsson, M., Mendel-Hartvig, M., and Landegren, U. (1998). Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic acids research* 26, 5073-5078.

Banning, C., Votteler, J., Hoffmann, D., Koppensteiner, H., Warmer, M., Reimer, R., Kirchhoff, F., Schubert, U., Hauber, J., and Schindler, M. (2010). A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. *PLoS One* 5, e9344.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., *et al.* (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, NY)* 220, 868-871.

Bastiaens, P.I., and Squire, A. (1999). Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends in cell biology* 9, 48-52.

Benson, R.E., Sanfridson, A., Ottinger, J.S., Doyle, C., and Cullen, B.R. (1993). Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *The Journal of experimental medicine* 177, 1561-1566.

Berggard, T., Linse, S., and James, P. (2007). Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 7, 2833-2842.

Buscher, K., Hahn, S., Hofmann, M., Trefzer, U., Ozel, M., Sterry, W., Lower, J., Lower, R., Kurth, R., and Denner, J. (2006). Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. *Melanoma research* 16, 223-234.

Callahan, R., Drohan, W., Tronick, S., and Schlom, J. (1982). Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 5503-5507.

Chakrabarti, L., Guyader, M., Alizon, M., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C., Tiollais, P., and Sonigo, P. (1987). Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* 328, 543-547.

Chatel-Chaix, L., Abrahamyan, L., Frechina, C., Mouland, A.J., and DesGroseillers, L. (2007). The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *Journal of virology* 81, 6216-6230.

Chatel-Chaix, L., Clement, J.F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L., and Mouland, A.J. (2004). Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Molecular and cellular biology* 24, 2637-2648.

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., *et al.* (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science (New York, NY)* 233, 343-346.

Coffin JM, H.S., Varmus HE (1997). *Retroviruses* (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Cullen, B.R. (1991). Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5, 2361-2368.

Desrosiers, R.C. (1988). Simian immunodeficiency viruses. *Annual review of microbiology* 42, 607-625.

Desrosiers, R.C., Daniel, M.D., and Li, Y. (1989). HIV-related lentiviruses of nonhuman primates. *AIDS research and human retroviruses* 5, 465-473.

Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Moulard, A.J., and DesGroseillers, L. (2005). Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic acids research* 33, 4797-4812.

Fernandez, S.M., and Berlin, R.D. (1976). Cell surface distribution of lectin receptors determined by resonance energy transfer. *Nature* 264, 411-415.

Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Luhrmann, R., and Rautmann, G. (1994). Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *The EMBO journal* 13, 4105-4112.

Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz *Annalen der Physik* 437, 55-75.

Frankel, A.D., and Young, J.A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry* 67, 1-25.

Fruh, K., Finlay, B., and McFadden, G. (2010). On the road to systems biology of host-pathogen interactions. *Future Microbiol* 5, 131-133.

Gadella, T.W., Jr et al. (1993). Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale. *Biophys Chem* 48, 221-239.

Gadella, T.W., Jr., and Jovin, T.M. (1995). Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *The Journal of cell biology* 129, 1543-1558.

Galli, U.M., Sauter, M., Lecher, B., Maurer, S., Herbst, H., Roemer, K., and Mueller-Lantzsch, N. (2005). Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. *Oncogene* 24, 3223-3228.

Ganser, B.K., Li, S., Klishko, V.Y., Finch, J.T., and Sundquist, W.I. (1999). Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science (New York, NY)* 283, 80-83.

- Gelderblom, H.R. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS (London, England)* 5, 617-637.
- Glasel, J.A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 18, 62-63.
- Gordon, G.W., Berry, G., Liang, X.H., Levine, B., and Herman, B. (1998). Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophysical journal* 74, 2702-2713.
- Gultekin, H., and Heermann, K.H. (1988). The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* 172, 320-329.
- Gustafsdottir, S.M., Schallmeiner, E., Fredriksson, S., Gullberg, M., Soderberg, O., Jarvius, M., Jarvius, J., Howell, M., and Landegren, U. (2005). Proximity ligation assays for sensitive and specific protein analyses. *Anal Biochem* 345, 2-9.
- Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326, 662-669.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., and Sharp, P.M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science (New York, NY)* 287, 607-614.
- Hanke, K., Chudak, C., Kurth, R., and Bannert, N. (2013a). The Rec protein of HERV-K(HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT). *International journal of cancer* 132, 556-567.
- Hanke, K., Hohn, O., Liedgens, L., Fidgeke, K., Wamara, J., Kurth, R., and Bannert, N. (2013b). Staufin-1 interacts with the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) rec and gag proteins and increases virion production. *Journal of virology* 87, 11019-11030.
- Hope, T.J. (1999). The ins and outs of HIV Rev. *Archives of biochemistry and biophysics* 365, 186-191.
- Ishaq, M., Hu, J., Wu, X., Fu, Q., Yang, Y., Liu, Q., and Guo, D. (2008). Knockdown of cellular RNA helicase DDX3 by short hairpin RNAs suppresses HIV-1 viral replication without inducing apoptosis. *Molecular biotechnology* 39, 231-238.
- Ivanusic D., Denner J., Bannert N. (2016). Correlative Förster Resonance Electron Transfer-Proximity Ligation Assay (FRET-PLA) Technique for Studying Interactions Involving Membrane Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, in Press
- Ivanušić, D. (2015). Molekulare Analyse der Protein-Protein-Interaktion des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1 mit CD63 (München: Verlag Dr. Hut), pp. XXII, 185 Seiten.
- Ivanusic, D., Eschricht, M., and Denner, J. (2014). Investigation of membrane protein-protein interactions using correlative FRET-PLA. *BioTechniques* 57, 188-191, 193-188.
- Karpova, T.S., Baumann, C.T., He, L., Wu, X., Grammer, A., Lipsky, P., Hager, G.L., and McNally, J.G. (2003). Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *Journal of microscopy* 209, 56-70.
- Kenworthy, A.K. (2001). Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods (San Diego, Calif)* 24, 289-296.

Kestler, H., Kodama, T., Ringler, D., Marthas, M., Pedersen, N., Lackner, A., Regier, D., Sehgal, P., Daniel, M., King, N., *et al.* (1990). Induction of AIDS in rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *Science (New York, NY)* 248, 1109-1112.

Kjems, J., and Sharp, P.A. (1993). The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *Journal of virology* 67, 4769-4776.

Klatt, N.R., Silvestri, G., and Hirsch, V. (2012). Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2.

Kremers, G.J., Goedhart, J., van Munster, E.B., and Gadella, T.W., Jr. (2006). Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. *Biochemistry* 45, 6570-6580.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lama, J., Mangasarian, A., and Trono, D. (1999). Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Current biology : CB* 9, 622-631.

Langner, J.S., Fuchs, N.V., Hoffmann, J., Wittmann, A., Brutschy, B., Lower, R., and Suess, B. (2012). Biochemical analysis of the complex between the tetrameric export adapter protein Rec of HERV-K/HML-2 and the responsive RNA element RcRE pck30. *Journal of virology* 86, 9079-9087.

Llopis, J., Westin, S., Ricote, M., Wang, Z., Cho, C.Y., Kurokawa, R., Mullen, T.M., Rose, D.W., Rosenfeld, M.G., Tsien, R.Y., *et al.* (2000). Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4363-4368.

Lower, R., Boller, K., Hasenmaier, B., Korbmacher, C., Muller-Lantzsch, N., Lower, J., and Kurth, R. (1993). Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 4480-4484.

Lower, R., Lower, J., and Kurth, R. (1996). The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5177-5184.

Lower, R., Tonjes, R.R., Korbmacher, C., Kurth, R., and Lower, J. (1995). Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *Journal of virology* 69, 141-149.

Lumpkin, O.J., DeJardin, P., and Zimm, B.H. (1985). Theory of gel electrophoresis of DNA. *Biopolymers* 24, 1573-1593.

Luo, M., Duchaine, T.F., and DesGroseillers, L. (2002). Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *The Biochemical journal* 365, 817-824.

Magin-Lachmann, C., Hahn, S., Strobel, H., Held, U., Lower, J., and Lower, R. (2001). Rec (formerly Corf) function requires interaction with a complex, folded RNA structure within its responsive element rather than binding to a discrete specific binding site. *Journal of virology* 75, 10359-10371.

Magin, C., Lower, R., and Lower, J. (1999). cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *Journal of virology* 73, 9496-9507.

Malim, M.H., Bohnlein, S., Fenrick, R., Le, S.Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989a). Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 8222-8226.

Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989b). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254-257.

Malim, M.H., Tiley, L.S., McCarn, D.F., Rusche, J.R., Hauber, J., and Cullen, B.R. (1990). HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* 60, 675-683.

Modrow, Susanne, Dietrich Falke, Uwe Truyen, and Hermann Schätzl. *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2010.

Mouland, A.J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L., and Cohen É, A. (2000). The Double-Stranded RNA-Binding Protein Staufen Is Incorporated in Human Immunodeficiency Virus Type 1: Evidence for a Role in Genomic RNA Encapsidation. *Journal of virology* 74, 5441-5451.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.

Pandrea, I., and Apetrei, C. (2010). Where the wild things are: pathogenesis of SIV infection in African nonhuman primate hosts. *Current HIV/AIDS reports* 7, 28-36.

Piston, D.W., and Kremers, G.J. (2007). Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in biochemical sciences* 32, 407-414.

Pollard, V.W., and Malim, M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology* 52, 491-532.

Rizzo, M.A., Springer, G., Segawa, K., Zipfel, W.R., and Piston, D.W. (2006). Optimization of pairings and detection conditions for measurement of FRET between cyan and yellow fluorescent proteins. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 12, 238-254.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.

- Sauter, M., Schommer, S., Kremmer, E., Remberger, K., Dolken, G., Lemm, I., Buck, M., Best, B., Neumann-Haefelin, D., and Mueller-Lantzsch, N. (1995). Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *Journal of virology* 69, 414-421.
- Schweitzer, B., Wiltshire, S., Lambert, J., O'Malley, S., Kukanskis, K., Zhu, Z., Kingsmore, S.F., Lizardi, P.M., and Ward, D.C. (2000). Immunoassays with rolling circle DNA amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10113-10119.
- Selvin, P.R. (2000). The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature structural biology* 7, 730-734.
- St Johnston, D., Beuchle, D., and Nusslein-Volhard, C. (1991). *Staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66, 51-63.
- St Johnston, D., Brown, N.H., Gall, J.G., and Jantsch, M. (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10979-10983.
- Stryer, L. (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annual review of biochemistry* 47, 819-846.
- Student (1908). THE PROBABLE ERROR OF A MEAN. *Biometrika* 6, 1-25.
- Temin, H.M., and Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.
- Thomas, M.G., Martinez Tosar, L.J., Desbats, M.A., Leishman, C.C., and Boccaccio, G.L. (2009). Mammalian *Staufen 1* is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J Cell Sci* 122, 563-573.
- Thomas, S.L., Oft, M., Jaksche, H., Casari, G., Heger, P., Dobrovnik, M., Bevec, D., and Hauber, J. (1998). Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *Journal of virology* 72, 2935-2944.
- Tonjes, R.R., Limbach, C., Lower, R., and Kurth, R. (1997). Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and mammalian cells. *Journal of virology* 71, 2747-2756.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Truong, K., and Ikura, M. (2001). The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Current opinion in structural biology* 11, 573-578.
- Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Jian, B., Epp, L., Lu, D.W., and Johanning, G.L. (2003). Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene* 22, 1528-1535.
- Weibrecht, I., Leuchowius, K.J., Clausson, C.M., Conze, T., Jarvius, M., Howell, W.M., Kamali-Moghaddam, M., and Soderberg, O. (2010). Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert review of proteomics* 7, 401-409.

- Weiss, R.A. (2006). The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* 3, 67.
- Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (1999). Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology* 19, 2220-2230.
- Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A., and Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of virology* 66, 7193-7200.
- Wouters, F.S., Bastiaens, P.I., Wirtz, K.W., and Jovin, T.M. (1998). FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *The EMBO journal* 17, 7179-7189.
- Xia, Z., and Liu, Y. (2001). Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophysical journal* 81, 2395-2402.
- Yang, J., Bogerd, H.P., Peng, S., Wiegand, H., Truant, R., and Cullen, B.R. (1999). An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13404-13408.
- Yedavalli, V.S., Neuveut, C., Chi, Y.H., Kleiman, L., and Jeang, K.T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* 119, 381-392.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Hr. Prof. Dr. Bannert bedanken, der es mir ermöglicht hat, meine Bachelorarbeit am Robert Koch-Institut anzufertigen. Mein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Daniel Ivanusic, der mich immer unterstützt hat, mir viele hilfreiche Anregungen gegeben hat und mir Vektoren zur Verfügung gestellt hat. Daneben gilt mein Dank Dr. Kazimierz Madela, der mir bei Fragen und Problemen bezüglich des Konfokalmikroskops zur Seite stand. Auch möchte ich mich bei meinen Kollegen für das kollegiale und freundliche Zusammensein bedanken.

Darüber hinaus möchte ich meiner Familie für ihre Unterstützung und ihr Verständnis danken.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Angelina Bloch, dass ich diese Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 6. Juni 2016

gez. Angelina Bloch