

**Interaktion von Reggie-2/Flotillin-1 mit HIV-1 Gag:  
Funktionelle Aspekte der Assemblierung und  
Ausschleusung Virus-ähnlicher Partikel**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Peter Beicht  
aus Bad Neuenahr-Ahrweiler

Frankfurt 2005  
DF1

## Danksagung

Danken möchte ich vor allem Frau Dr. Ritva Tikkanen für die fachkundige und stets engagierte Betreuung meiner Promotion. Mit ihrer Diskussionsfreudigkeit und ihrer Begeisterung für Biologie hat sie mich und diese Arbeit sehr unterstützt.

Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferats seitens der biologischen Fakultät der Universität Frankfurt.

Herrn Dr. Bernd Kupfer danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung von Arbeiten mit infektiösem Material.

Frau Prof. Dr. Claudia Stürmer danke ich für die Reggie-cDNA, Frau Prof. Dr. Marilyn Resh für das Gag-EGFP-Konstrukt und Herrn Prof. Dr. Hans Georg Kräusslich für das Gag-pCDNA-Konstrukt. Frau Priv.-Doz. Dr. Anna-Maria Eis-Hübinger danke ich für den HSV-spezifischen Antikörper.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tikkanen für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie II der Universitätsklinik Frankfurt, besonders Herrn Prof. Dr. Werner Müller-Esterl, für ihre Unterstützung und das gute Arbeitsklima. Ebenfalls bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie der Universität Bonn, in dem diese Arbeit begonnen wurde.

Ganz herzlich danke ich Jana, meiner Familie, Christian (Zwiebel), Alex (Crockett), Jens (Puffin) und Bodo (numpsi), die immer für mich da sind.

<b>LISTE DER PUBLIKATIONEN UND POSTERBEITRÄGE</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Lipid Rafts</b>	<b>3</b>
1.1.1 Die Zellmembran	3
1.1.2 Struktur von Lipid Rafts	4
1.1.3 Raft-Typen	6
<b>1.2 Funktionelle Aspekte von Rafts</b>	<b>7</b>
1.2.1 Rafts und Signaltransduktion	7
1.2.2 Rafts und Membrantransport	8
<b>1.3 Reggie Proteine</b>	<b>10</b>
1.3.1 Subzelluläre Lokalisation der Reggie-Proteine in Geweben und Zelllinien	11
1.3.2 Funktionelle Aspekte der Reggie-Proteine	13
<b>1.4 Das humane Immundefizienz Virus 1 (HIV-1) und Lipid Rafts</b>	<b>15</b>
1.4.1 Das erworbene Immunschwäche Syndrom	15
1.4.2 Das humane Immundefizienz-Virus 1	16
1.4.3 Replikationszyklus von HIV-1	18
1.4.4 Virusassemblierung und Lipid Rafts	20
1.4.5 Der Ort der Partikelproduktion ist Zelltyp-abhängig	21
<b>1.5 Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Chemikalien und spezielle Reagenzien</b>	<b>23</b>
2.1.1 Antikörper	24
2.1.2 Puffer und Lösungen	25
2.1.3 Bakterien-, Hefestämmen und Zelllinien	27
2.1.4 Kits und Enzyme	27
2.1.5 Desoxyoligonukleotide	28
2.1.6 Plasmide und cDNAs	29
<b>2.2 DNA-Analyse</b>	<b>29</b>
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion, Restriktionsverdau und Ligation	29
2.2.2 Klonierung von cDNA-Fragmenten	30
<b>2.3 Expressionskonstrukte</b>	<b>30</b>
2.3.1 Herstellung von Reggie-Expressionsvektoren	30
2.3.2 HIV Gag Konstrukte	31
2.3.3 Konstrukte für Y2H	31
<b>2.4 In vitro Studien</b>	<b>32</b>
2.4.1 Yeast two-hybrid Analyse	32
2.4.2 <i>In vitro</i> Transkription und Translation	34
2.4.3 Bindungsstudien <i>in vitro</i> translatierter Proteine	34
2.4.4 HIV p24-ELISA	35

<b>2.5 Zellkultur Studien</b>	<b>35</b>
2.5.1 Kultur eukaryotischer Zelllinien	35
2.5.2 Transfektion	35
2.5.3 Immunfluoreszenz	36
2.5.4 Präparation Virus-ähnlicher Partikel (VLP)	36
2.5.5 Verminderung der Proteinexpression durch siRNA	37
2.5.6 Isolierung und Infektion primärer Lymphozyten	37
<b>2.6 Biochemische Methoden</b>	<b>38</b>
2.6.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.6.2 Immunoblotting	38
2.6.3 Koimmunpräzipitation	39
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Direkte Interaktion der Reggie-Proteine mit dem HIV Strukturprotein Gag</b>	<b>40</b>
3.1.1 Yeast two-hybrid Analyse	40
3.1.2 Reggie-Proteine bilden Homo- und Heteroligomere	42
3.1.3 Reggie-2 interagiert mit HIV-1 Gag im Yeast two-hybrid System	43
3.1.4 <i>In vitro</i> Bindungs-Studien	45
<b>3.2 Expression Epitop-markierter Reggie-2 Varianten in Säugerzellen</b>	<b>48</b>
<b>3.3 Reggie-2 und HIV-1 Gag kolokalisieren in Säugerzellen</b>	<b>49</b>
3.3.1 Reggie-2 zeigt unterschiedliche Lokalisation in verschiedenen Zelltypen	49
3.3.2 Endogene Reggie-Proteine kolokalisieren mit HIV-1 Gag-EGFP in HeLa-Zellen	51
3.3.3 Überexpression von Reggie-2 führt zu einer Umverteilung von HIV-1 Gag	53
3.3.4 Reggie-2 und Gag kolokalisieren mit Proteinen des ESCRT-Komplexes in HeLa-Zellen	55
<b>3.4 Interaktion von Reggie-2 und HIV-1 Gag in vivo</b>	<b>58</b>
3.4.1 Gag coimmunpräzipitiert endogenes Reggie-2 in HeLa Zellen	58
3.4.2 Reggie-Proteine sind in virusähnlichen Partikeln vorhanden	59
3.4.3 Herabregulierung der Reggie-Proteine mittels siRNA führt zu erhöhter Partikelfreisetzung in HeLa Zellen	60
<b>3.5 Interaktion von Reggie-2 und HIV-1 Gag in Virus-infizierten primären Lymphozyten</b>	<b>62</b>
3.5.1 Native HIV-Partikel enthalten Reggie-1 und Reggie-2	62
3.5.2 Reggie-2 kolokalisiert mit HIV-Gag in primären infizierten Lymphozyten	64
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>66</b>
<b>4.1 Strukturelle Aspekte der Reggie-Proteine</b>	<b>66</b>
<b>4.2 Reggie-2 – Ein neuer Interaktionspartner von HIV Gag</b>	<b>67</b>
4.2.1 Interaktion von Reggie-2 mit Gag	67
4.2.2 HIV und Lipid Rafts	69
4.2.3 Reggie-2-Überexpression erhöht die Plasmamembran-Lokalisation von Gag	72
4.3 Integration von zellulären Proteinen in HIV-Partikel	74
<b>4.4 Effekte der Reggie-2-Expression auf Gag</b>	<b>78</b>
4.4.1 Herabregulierung von Reggie-2 erhöht die Freisetzung von VLP	78
4.4.2 HIV Gag, Reggie-2 und das ESCRT-System	79
<b>4.5 Ausblick</b>	<b>81</b>
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>83</b>

<b>LEBENS LAUF</b>	<b>93</b>
--------------------	-----------

<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>94</b>
------------------	-----------

## Liste der Publikationen und Posterbeiträge

### Publikationen

Kupfer B, Kaiser R, **Beicht P**, Brackmann HH, Matz B, Schneweis KE (1998). 28. Hämophilie-Symposium Hamburg 1997, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York: 173-177

Tikkanen R, Icking A, **Beicht P**, Waneck GL, Herzog V (2002). The receptor-bound N-terminal ectodomain of the amyloid precursor protein is associated with membrane rafts. *Biol Chem* 383: 1855-1864.

Neumann-Giesen C, Falkenbach B, **Beicht P**, Claasen S, Luers G, Stuermer CA, Herzog V, Tikkanen R (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem J* 378: 509-518.

**Beicht P**, Kupfer B, Ruonala M, Tikkanen R. Lymphocyte raft protein reggie-2/flotillin-1 directly interacts with HIV-1 Gag polyprotein and plays a role in virus release. (Manuskript in Bearbeitung)

### Posterbeiträge

- 02.-03. März 2002 6. Semestermeeting des Bonner Forum Biomedizin, Walberberg
- 03.-06. März 2002 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie in Heidelberg
- 22.-23. Feb 2003 7. Semestermeeting des Bonner Forum Biomedizin, Walberberg
- 21.-24. Sept 2003 Jahrestagung der European Life Science Organisation in Dresden
- 03.-07. Sept 2004 Jahrestagung der European Life Science Organisation in Nizza, Frankreich
- 03.-06. Sept 2005 Jahrestagung der European Life Science Organisation in Dresden

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom ( <i>Aquired Immunodeficiency Syndrome</i> )
APS	Ammoniumpersulfat
BD	Bindedomäne
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CA	Kapsid
CAP	c-cbl assoziiertes Protein
CCR5	Chemokin (CC Motif) Rezeptor 5
cDNA	komplementär DNA ( <i>complementary DNA</i> )
Ci	Curie
CXCR4	Chemokin (CXC Motif) Rezeptor 4
CypA	Zyklophilin A
DIG	Detergenz-unlösliche Glykolipid-angereicherte Komplexe
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DRM	Detergenz resistente Membran
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ESA	<i>epidermal surface antigen</i>
ESCRT	<i>epidermal sorting complex required for transport</i>
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>foetal calf serum</i> )
FRET	Fuoreszenz Resonanz Energietransfer
g	Gravitation (1g entspricht $9,81 \text{ m/sec}^2$ )
Gag	Gruppen-spezifisches Antigen
gp	Glykoprotein
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HA	Hämagglutinin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	Merrettich Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV-1	Humanes T-lymphotropes Virus 1
IP	Immunpräzipitation
kBp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
LiAc	Lithiumacetat
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MA	Matrix
MeOH	Methanol
MVB	<i>multivesicular body</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

NC	Nukleokapsid
NO	Stickstoffoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	<i>preassembled platform</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <i>phosphat buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PrPc	Prionenprotein, physiologische Form ( <i>cellular</i> )
PrPsc	Prionenprotein, amyloide Form ( <i>scrapie</i> )
RGZ	Retinale Ganglienzellen
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natrium-Laurylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOEING	<i>splicing by overlap extension</i>
SoHo	Sorbin-Homologie
SPFH	Stomatin /Prohibitin / Flotillin / HflK/C
SV40	<i>simian virus 40</i>
TBST	<i>tris buffered saline Tween</i>
TGN	Trans-GolgiNetzwerk
TM	Schmelztemperatur
TNE	Tris-NaCl- EDTA
v/v	<i>volume per volume</i>
VLP	Virus-ähnliche Partikel ( <i>virus like particle</i> )
VP	Virus Protein
w/v	<i>weight per volume</i>
Y2H	<i>yeast two-hybrid</i>



### Zusammenfassung

Reggie-1 und Reggie-2 stellen eine über diverse Spezies konservierte Proteinfamilie dar und werden in den meisten Geweben exprimiert. Die physiologische Funktion dieser Proteine ist bisher nicht geklärt. Die Reggie-Proteine wurden zunächst im Zusammenhang mit der Regeneration von Axonen retinaler Ganglienzellen des Goldfisches beschrieben. In diesen Zellen wird die Expression beider Proteine nach Läsion des Nervs hochreguliert. Unabhängig davon wurden Reggies aufgrund ihres Sedimentationsverhaltens in Dichtegradienten als Flotilline beschrieben. Dabei ist Reggie-1 identisch mit Flotillin-2 und Reggie-2 mit Flotillin-1. Beide Reggie-Proteine sind Raft-assoziiert. Bei Rafts handelt es sich um Membran-Mikrodomänen, deren Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen wie Signaltransduktion, Endozytose und dem Transport von Proteinen beschrieben wurde. Strukturell zeichnen sich Rafts durch einen im Vergleich zur restlichen Membran erhöhten Anteil an Cholesterol und Sphingolipiden aus, der unter anderem in einer herabgesetzten lateralen Beweglichkeit der beteiligten Moleküle resultiert, und so Sortierungs- und Signalgänge innerhalb der Zelle begünstigt.

Aus der Beobachtung, dass Reggie-2 mit dem Struktur-Vorläuferprotein des Rotavirus interagiert, ergab sich die Fragestellung zu dieser Arbeit. Das Ausschleusen von Rotaviren aus infizierten Zellen ist von Rafts abhängig. Die strukturellen Eigenschaften des Rotavirus-Proteins ähneln Gag, dem Struktur-Vorläuferprotein des Humanen Immundefizienz-Virus und verwandter Retroviren. Das HIV Gag-Protein ist außerhalb des viralen Kontext nach Expression in der Lage, an zellulären Membranen zu assemblieren und Virus-ähnliche Partikel zu bilden. Die molekularen Abläufe dieses Vorgangs, der als *budding* bezeichnet wird, sind noch nicht im Detail verstanden. Sie werden jedoch sowohl für Gag allein, als auch für die Virusproduktion in infizierten Zellen mit Rafts in Verbindung gebracht. Ein Hinweis darauf ergibt sich aus der Tatsache, dass HIV-infizierte Zellen nach Cholesterol-Depletion kein produktives Virus mehr abschnüren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Reggie-2 mit HIV-1 Gag interagiert und sich Veränderungen der Reggie-2 Expressions sowohl auf die

zelluläre Lokalisation von Gag als auch auf die Produktion Virus-ähnlicher Partikel auswirkt. Die Überexpression von Reggie-2 in HeLa-Zellen führt zu einer Umverteilung von Gag mit erhöhter Lokalisation an der Plasmamembran, an der es dann stark mit Reggie-2 kolokalisiert. Die Verminderung der Reggie-2 Expression mittels siRNA resultiert in einer erhöhten Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel aus Gag-transfizierten HeLa-Zellen und in einer eher löslichen Lokalisation des viralen Proteins im Zytoplasma.

Der Ort des *buddings* von HIV ist Zelltyp-abhängig und involviert die zelluläre ESCRT-Maschinerie, die physiologisch für das Sortieren von Proteinen in *multivesicular bodies* (MVBs) zuständig ist. Gag rekrutiert das ESCRT-System, indem es über ein kurzes Aminosäuremotif an das ESCRT-I Protein TSG101 bindet und dabei die Eigenschaft des zellulären Proteins HRS nachahmt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Reggie-2 in HeLa-Zellen mit Komponenten der ESCRT-Maschinerie kolokalisiert. Dabei ist denkbar, dass eine Verbindung zwischen ESCRT und Reggie-Proteinen besteht, da Rafts als Signal- und Sortier-Plattformen die physiologischen Prozesse begünstigen könnten, die bei der Funktion von MVBs eine Rolle spielen.

Im Gegensatz zu Reggie-2 findet keine Interaktion von Gag mit Reggie-1 statt. Beide Reggie-Proteine sind jedoch biochemisch in produktiven Viren infizierter primärer T-Zellen nachweisbar. Des Weiteren zeigen Immunfluoreszenz-Studien infizierter Lymphozyten, dass beide Reggies in diesen Zellen in einem großen Ausmaß mit Gag kolokalisieren. Der Grund dafür ist wahrscheinlich die Fähigkeit der Reggies zur Homo- und Heterooligomerisierung. Die direkte und spezifische Interaktion von Gag mit dem Raft-assoziierten Protein Reggie-2 konnte mit verschiedenen Methoden gezeigt werden. Dabei können die Ergebnisse als Grundlage für ein besseres Verständnis der HIV-Pathogenese dienen, und zusätzlich gibt die mögliche Verbindung von Reggies zum ESCRT-Komplex neue Hinweise auf die zelluläre Funktion dieser Raft-Proteine.

# 1 Einleitung

## 1.1 Lipid Rafts

### 1.1.1 Die Zellmembran

Die Plasmamembran eukaryotischer Zellen ist eine hochselektive Permeabilitäts-schranke, die die Zelle von ihrer Umgebung abtrennt. Sie hat eine zwei-dimensionale, Flüssigkeits-ähnliche Struktur und besteht aus Lipiden und Proteinen, die hauptsächlich durch nicht-kovalente Interaktionen wie Wasserstoff-Brückenbindungen, elektrostatische oder Van der Waals-Kräfte miteinander verbunden sind. Nach ihrer Struktur können in biologischen Membranen bis zu 500 verschiedene Lipidarten unterschieden werden, hauptsächlich handelt es sich um neutrale Glykolipide, Glykophospholipide, Ceramide, Glykosphingolipide, Sphingomyeline und Cholesterol [Edidin 2003, Pomorski *et al.* 2001].

Im Jahr 1972 stellten Singer und Nicholson das „Flüssig-Mosaik“-Modell vor, das die Zellmembran als eine zweidimensionale Flüssigkeit erklärt, in der sich Proteine und Lipide lateral frei bewegen können. Die Hauptfunktion der Lipide besteht nach dem Modell darin, als Lösungsmittel für Proteine zu fungieren [Singer und Nicolson 1972]. Die molekulare Organisation einer Lipid-Doppelschicht und somit auch die Fluidität der Zellmembran hängt zum einen von der Lipidstruktur (Kopfgruppe, Grundgerüst, Länge und Grad der Sättigung der Fettsäuren) und zum anderen von physikalischen Bedingungen wie zum Beispiel Druck und Temperatur ab. Thermodynamisch können dabei drei Organisationsformen artifizieller Lipid-Doppelschichten unterschieden werden. Abhängig von der Schmelztemperatur  $T_M$  der Lipide unterscheidet man eine geordnete Festphase (S), eine ungeordnete Flüssigphase ( $L_d$ ) und eine geordnete Flüssigphase ( $L_o$ ).

Experimentelle und theoretische Untersuchungen an Liposomen und Modellmembranen zeigten, dass verschiedene Lipide Aggregate bilden und so aus der  $L_d$ -Phase seggregieren [Schröder *et al.* 1994, Dietrich *et al.* 2001]. Bei diesen

Lipiden handelt es sich um Cholesterol, Glykophospholipiden und gesättigten Sphingolipiden wie Sphingomyelin sowie Glykosphingolipiden. Schon einige Jahre früher konnte gezeigt werden, dass verschiedene Lipidspezies in der Membran lateral ungleichmäßig verteilt sind [van Meer 1989]. Des Weiteren weisen die apikale und basolaterale Membran polarer Epithelzellen eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung auf [Simons und van Meer 1988]. Das „Flüssig-Mosaik“-Modell bedurfte also einer Erweiterung, die die lateralen Inhomogenitäten in Membranen in Betracht zieht, welche sich aus dem physikalischen Zustand der Lipide und der Mischbarkeit der Komponenten ergibt.

### 1.1.2 Struktur von Lipid Rafts

In Epithelzellen ist die Plasmamembran in eine apikale und eine basolaterale Domäne unterteilt, wobei letztere einen größeren Anteil an Phosphatidylcholin enthält. Ebenfalls sind bestimmte Proteine in der Membran von polarisierten Zellen wie der Nieren-Zelllinie MDCK asymmetrisch verteilt, z.B. sind GPI-verankerte Proteine und manche Rezeptoren ausschließlich in der apikalen Domäne lokalisiert. Um diese ungleiche Verteilung zu erklären, wurde postuliert, dass aufgrund der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Lipide bereits im Golgi-Apparat Ansammlungen von Sphingolipiden und Cholesterol als Sortierstation für apikal gerichtete Proteine dienen. Diese Ansammlungen wurden als „Rafts“ (engl. : Flöße) bezeichnet. Die ursprüngliche Raft-Hypothese zog die Möglichkeit in Betracht, dass die laterale Kompartimentierung von Lipiden in der Zellmembran eine physiologische Relevanz haben könnte. Die Hypothese postulierte, dass Cholesterol und (Glyko)-Sphingolipide spontan aggregieren und Plattformen bilden, in die bestimmte Proteine, wie zum Beispiel GPI-verankerte Proteine, segregieren. Rafts wurden eine Rolle in der Sortierung von Membranproteinen, der Zelladhäsion und in Signalprozessen zugesprochen [Simons und Ikonen 1997]. Biochemische Hinweise auf die Existenz dieser Plattformen lieferte die Entdeckung, dass ein Anteil von Membrankomponenten bei 4°C in dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 unlöslich ist und in Dichtegradienten von restlichen Membranbestandteilen getrennt wird. Weitere Bezeichnungen für Rafts sind DIGs (*detergent-insoluble glycolipid-enriched*

*complexes*) oder DRMs (*detergent resistant membranes*). Die Bildung dieser Plattformen kann mit den strukturellen Eigenschaften von Sphingolipiden und Cholesterol erklärt werden. Die langen, gesättigten Fettsäuren der Sphingolipide lassen eine dichte Packung zu; Cholesterol füllt die Zwischenräume aus, die durch die Größe der Lipidkopfgruppen entstehen. Zusammen liegen diese Moleküle unter physiologischen Bedingungen in der L<sub>o</sub>-Phase vor. Im Gegensatz dazu sind die Fettsäuren der Phospholipide ein- oder mehrfach ungesättigt, diese Moleküle neigen so zur L<sub>D</sub>-Phase.

Durch die asymmetrische Verteilung der Lipide im inneren und äußeren Blatt der Membran stellte sich die Frage, ob Rafts auch auf der inneren Seite der Plasmamembran existieren. FRET-Studien (*fluorescence resonance energy transfer*) konnten diesbezüglich zeigen, dass acylierte Proteine an der Innenseite akkumulieren [Zacharias *et al.* 2002]. Eine andere Arbeit, in der die Verteilung von H-Ras- und K-Ras-Fusionsproteinen elektronenmikroskopisch untersucht wurde, zeigte, dass im zytoplasmatischen Teil der Plasmamembran ca. 40 nm durchmessende Anhäufungen dieser Proteine vorliegen [Prior *et al.* 2003]. Zwischen den Rafts der äußeren und der inneren Seite der Plasmamembran scheinen dabei Interaktionen stattzufinden. So führt zum Beispiel die Antikörpervermittelte Quervernetzung der GPI-verankerten Phosphatase PLAP zu deren Kolo-kalisation mit der src-Kinase fyn [Harder *et al.* 1998].

Die Größe von Rafts in ruhenden Zellen ist noch nicht abschließend geklärt. Die meisten Arbeiten in diesem Feld beschreiben Rafts nach Antikörpermarkierung, durch die Rafts aggregieren, oder bei niedrigen, nicht-physiologischen Temperaturen. Momentan wird angenommen, dass der Durchmesser von Rafts in den meisten ruhenden Zellen unterhalb des Auflösungsvermögens verfügbarer Mikroskope liegt [Übersicht in Kusumi *et al.* 2004]. Eine Ausnahme scheinen T-Zellen darzustellen, in denen im nicht-aktivierten Zustand „kappenartige“ Strukturen beschrieben wurden, deren Durchmesser bis zu 10 µm betragen kann [Rajendran *et al.* 2003].

### 1.1.3 Raft-Typen

Die Extraktion von Zellen mit dem Detergenz Triton X-100 führt nicht zu der Isolierung einheitlicher Raft-Formen. Unabhängig von experimentellen Bedingungen wie Temperatur oder verwendetem Detergenz existieren wahrscheinlich eine Vielzahl verschiedener, hochspezialisierter Plattformen innerhalb von Membranen, die beispielsweise durch Rezeptor-Ligand-Bindung aktiviert und zu größeren Aggregaten zusammengeschlossen werden. Eine aktuelle Arbeit definiert ein Lipid Raft als einen molekularen Komplex aus mindestens drei Molekülen, von denen eines ein Lipid mit gesättigter Alkylkette oder Cholesterol sein muss. Ausgehend von dieser einfachen Beschreibung sind eine Vielzahl spezialisierter, grösserer Komplexe möglich [Kusumi *et al.* 2004].

Schon sehr früh beschriebene Mikrodomänen der Plasmamembran sind Caveolae (lat.: kleine Höhlen). Es handelt sich um tubulusartige Einstülpungen der Plasmamembran mit einem Durchmesser von 50 bis 100 nm, deren Hauptproteinbestandteil Caveolin ist. Die Familie der Caveoline besteht bei Säugetieren aus den drei Proteinen Caveolin-1, -2 und -3. Die beiden erstgenannten werden in vielen Zellen koexprimiert und bilden Heterooligomere, deren Expressionsspiegel in Adipozyten besonders hoch ist. Caveolin-3 hingegen wird hauptsächlich in Muskelzellen exprimiert [Smart *et al.* 1999]. Caveoline interagieren direkt mit Cholesterol und bilden so das Grundgerüst der Caveolae. Der heterooligomere Charakter der Proteine spielt dabei eine funktionelle Rolle, da in Caveolin-1-defizienten Mäusen keine sichtbaren Caveolae ausgebildet werden [Drab *et al.* 2001]. Die Hauptaufgaben der Caveolae bestehen in der Endozytose von Rezeptoren und extrazellulären Molekülen, dem Transport von Cholesterol und der Ausbildung von Signalplattformen [Brown und London 1998, Galbiati *et al.* 2001]. Zusätzlich erfüllt Caveolin Funktionen in der Zelle durch Interaktion mit anderen Proteinen. So konnte zum Beispiel eine direkte Interaktion von Caveolin-1 mit den Stickstoffoxid-Synthasen eNos und nNos gezeigt werden [Sato *et al.* 2004]. Die Wirkung der NO-Produktion wird durch diese Interaktion gehemmt. Nos ist außerdem palmitoyliert, was auf eine Raft-Assoziation hindeutet. NO ist in sehr geringen Mengen wirksam und eine

funktionelle Bedeutung der gezielten, lokalen Nitrierung von Raft-Proteinen wird diskutiert [Dremina *et al.* 2005].

## 1.2 Funktionelle Aspekte von Rafts

### 1.2.1 Rafts und Signaltransduktion

Die ersten Hinweise auf eine Funktion von Rafts in der Signaltransduktion entstammen Studien von Signalwegen, die durch GPI-verankerte Proteine vermittelt werden. Der Verlauf dieser Signaltransduktion beinhaltet die Ligand-induzierte Rezeptoraggregation mit anschließender Kinase-Aktivität und Signalkaskade in das Innere der Zelle. Bemerkenswert dabei ist, dass GPI-verankerte Proteine ins äußere Blatt der Membran integriert sind und keinen physikalischen Kontakt zum Zytoplasma haben. Derzeit werden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen, die die Interaktion von GPI-verankerten Proteinen in Rafts mit Proteinen des inneren Blattes der Plasmamembran erklären können. Eine experimentell belegte Möglichkeit ist, dass nach Bildung von Rafts im äußeren Blatt Transmembranproteine rekrutiert und angesammelt werden, die durch Di- oder Oligomerisierung mit nachfolgender Phosphorylierung auf der zytoplasmatischen Seite Signale weiterleiten. Dies wurde für den GPI-verankerten Rezeptor  $GFR\alpha-1$  gezeigt, der durch den Wachstumsfaktor GDNF (*glial-cell-line-derived neurotrophic factor*) aktiviert wird [Klein *et al.* 1997, Takahashi 2001].

Andere Signalwege werden direkt durch die Aktivierung von Transmembran-Rezeptor-Komplexen nach deren Aggregation in Rafts induziert. Frühe Studien zeigten so beispielsweise, dass die Aktivierung des IgE-Rezeptors  $Fc\epsilon RI$  zu dessen Aggregation und zur Aktivierung der src-Kinase lyn führt. Die darauf folgende Signalkaskade führt in basophilen und Mast-Zellen zur Degranulation. Verschiedene gesättigte Lipide, die in artifiziellen Membransystemen in der  $L_0$ -Phase vorliegen, kolokalisieren mit dem aggregierten Rezeptor [Thomas *et al.* 1994]. In der letztgenannten Arbeit konnte ausserdem biochemisch gezeigt werden, dass ein Anteil des Rezeptors nach der Ligand-induzierten Aktivierung in

DRMs vorliegt, und dass nur dieser Anteil von der Kinase Lyn phosphoryliert wird. Eine Depletion des zellulären Cholesterols verhindert die Transduktion des Signals, was einen weiteren Hinweis auf Raft-Involvierung gibt. Ein ähnlicher Mechanismus wurde mittlerweile für eine Vielzahl weiterer Proteine beschrieben, so zum Beispiel für die Aktivierung des B- und T-Zell-Rezeptors.

### 1.2.2 Rafts und Membrantransport

Der intrazelluläre Transport von Proteinen und Lipiden hängt zu einem Großteil von deren Verpackung in Vesikel, dem Transport dieser Vesikel durch die Zelle und dem Verschmelzen der Vesikel mit Membranen ab. Die Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran wird als Exozytose bezeichnet; dabei wird der Inhalt der Vesikel in den extrazellulären Raum entlassen, die Vesikelmembran geht in die Plasmamembran über. Man unterscheidet zwischen konstitutiver und regulierter Exozytose, letztere ist in den meisten Fällen von einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration abhängig [Gerber *et al.* 2002]. Die Fusion der Membranen wird von SNARE Proteinen vermittelt, die mit Raft-assoziierten Proteinen kolokalisieren und resistent gegenüber Detergenz-Extraktion sind. Cholesterol-Depletion in Zellen führt ausserdem dazu, dass die regulierte Exozytose zum Erliegen kommt [Lafont *et al.* 1999, Chamberlain *et al.* 2001]. Des Weiteren sind SNARE-Proteine palmytyliert, was ein Indiz für eine Raft-Assoziation ist. Aminoternale Lipidmodifikationen wie Palmytylierung oder Myristylierung sind als Marker für die Raft-Lokalisation von Proteinen beschrieben worden [McCabe *et al.* 1999, Morrow *et al.* 2002, Neumann-Giesen *et al.* 2004]. Der Fusionsort von Vesikel- mit anderen zellulären Membranen könnte ebenfalls in Rafts lokalisiert sein. Ein Hinweis darauf ist die Assoziation des für Kalzium-abhängige Exozytose notwendigen Lipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) mit dem inneren Blatt von DRMs [Hope *et al.* 1996, Hay *et al.* 1995]. Der Weg der konstitutiven Exozytose verläuft vom Transgolgi-Netzwerk (TGN) zur Plasmamembran und dient der Aufrechterhaltung der Lipid- und Proteinzusammensetzung dieser Membran. Die Existenz von DRMs im Golgi-Apparat konnte gezeigt werden und ein Zusammenhang von Rafts als



Sortierplattform für Proteine und apikalem bzw. basolateralen Transport wird diskutiert [Simons und van Meer 1988, Simons und Ikonen 1997].

Ein weiterer Weg der Exozytose verläuft über sogenannte *multivesicular bodies* (MVBs). Bei diesem Vorgang knospen 50 bis 100 nm durchmessende Exosomen in das Lumen eines endosomalen Kompartiments ab, wodurch MVBs generiert werden. Der Inhalt wird entweder lysosomal degradiert oder durch Verschmelzen der MVBs mit der Plasmamembran an die Umgebung der Zelle abgegeben. Erstmalig beschrieben wurden Exosomen bei der Differenzierung von Retikulozyten in Erythrozyten. Während der Reifung entledigen sich die Zellen des nicht mehr benötigten Transferrin-Rezeptors [Pan und Johnstone 1983]. Bereits in frühen elektronenmikroskopischen Analysen konnte die Existenz von Vakuolen, die eine Vielzahl endosomaler Vesikel enthalten, gezeigt werden [Trump *et al.* 1965]. Bei diesen multivesikulären Körpern handelt es sich um ein Zwischenstadium zwischen frühen und späten Endosomen, die in die Sortierung von Proteinen involviert sind. Bei der Herabregulierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren werden diese endozytiert und über endosomale Kompartimente zu Lysosomen transportiert, wo sie schließlich degradiert werden. Das Sortieren erfolgt dabei durch die Proteinkomplexe des ESCRT-Systems (*endosomal sorting complex required for transport*) [Katzmann *et al.* 2003]. Die Maschinerie, die Proteine in MVBs sortiert, ist zu einem Großteil aufgeklärt. Sie besteht aus den drei ESCRT-Komplexen I, II und III, die aufeinander folgend mono-ubiquitinierte Proteine erkennen und in Membrandomänen einschleusen, welche die intraluminalen Vesikel der MVBs auskleiden [Katzmann *et al.* 2002]. Die selektive Anreicherung von GPI-verankerten Proteinen und das Cholesterol-Phospholipid-Verhältnis der Exosom-Membran deuten dabei auf eine Raft-Beteiligung in diesem Prozess hin [Vidal *et al.* 1989, Rabesandratana *et al.* 1998]. Die Eigenschaft, bestimmte Proteine selektiv aufzunehmen und andere auszuschliessen, ergibt dabei für Lipid Rafts eine ideale Voraussetzung, zelluläre Sekretionsvorgänge zu organisieren und räumlich zu trennen. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass die Sortierung in MVBs begünstigt wird, wenn die laterale Diffusion der involvierten Moleküle verlangsamt ist [de Gassart *et al.* 2004].

### 1.3 Reggie Proteine

Die Reggie-Proteinfamilie umfasst die Proteine Reggie-1 und Reggie-2. Sie gehören zu einer Gruppe von Proteinen mit einer sogenannten SPFH-Domäne (Stomatin / Prohibitin / Flotillin / HflK/C), deren Funktion bislang noch unklar ist [Tavernarakis *et al.* 1999]. Ursprünglich wurden die Reggie-Proteine als axonale Regenerationsproteine des Goldfisch-Sehnervs beschrieben [Schulte *et al.* 1997]. Die retinalen Ganglienzellen (RGZ) des Goldfischs besitzen die Fähigkeit, ihre Axone nach Verletzung des optischen Nerven zu regenerieren. Bei Säugetieren ist im Vergleich zu Fischen die zelluläre Antwort auf eine solche Läsion unvollständig [Shearer *et al.* 2001]. Durch eine Läsion der RGZ kommt es bei Fischen zu einer massiven Hochregulation der Proteinsynthese, insbesondere von solchen Proteinen, die normalerweise in frisch differenzierten retinalen Ganglienzellen und Axonen exprimiert werden. Hierzu zählen beispielsweise Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (NCAM) und Gap-43.

Zur gleichen Zeit der Entdeckung der Reggie-Proteine wurden die Flotilline (*float*, engl: schweben) beschrieben, die auf der Suche nach neuen integralen Membranproteinen als Bestandteil von Caveolae entdeckt wurden. Es zeigte sich, dass Flotillin-1 identisch mit Reggie-2 und Flotillin-2 identisch mit Reggie-1 ist [Bickel *et al.* 1997]. Die Bezeichnung resultiert aus dem Sedimentationsverhalten der Proteine in Saccharose-Gradienten. Entgegen der ursprünglichen Beschreibung handelt es sich bei den Reggie-Proteinen allerdings nicht um Caveolae-Proteine [Lang *et al.* 1998]. Unabhängig davon stellte sich heraus, dass es sich bei dem 1994 beschriebenen Protein ESA (*epidermal surface antigen*) um eine N-terminal um 50 Aminosäuren verkürzte Form von Reggie-1 handelt [Schröder *et al.* 1994, Lang *et al.* 1998].

Die Reggie-Proteine sind hochkonserviert: Beide Proteine bestehen aus 428 Aminosäuren, haben eine molekulare Masse von ca. 47 kDa und zeigen ca. 45% Sequenzidentität in allen Spezies. Die humane Reggie-2 cDNA zeigt 90% Identität mit Maus-Reggie-2, auf Proteinebene beträgt die Homologie 99% [Bickel *et al.* 1997]. Humanes Reggie-2 zeigt auf Proteinebene 47% Identität und 70% Sequenzhomologie mit humanem Reggie-1 [Edgar *et al.* 2001]. Datenbank-recherchen zeigten, dass es wahrscheinlich keine Reggie-homologen Proteine in

der Hefe gibt, es wurden jedoch Reggie-Homologe in *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* [Galbiati *et al.* 1998, Edgar *et al.* 2001, Borner *et al.* 2005] nachgewiesen. Zusammen mit der Sequenzhomologie lässt dies auf eine konservierte Funktion dieser Proteine in eukaryotischen Zellen schließen. Des Weiteren fanden sich „bakterielle Flotilline“ z.B. in *Bacillus subtilis* und *Streptomyces coelicolor* mit einer Sequenzidentität von 23-35% und einer Sequenzähnlichkeit von 58-66% [Huang *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2005].

Das humane Reggie-2 Gen ist 15 kB groß und in der MHC Klasse 1-Region des Chromosoms 6 lokalisiert [Edgar *et al.* 2001], humanes Reggie-1 ist auf Chromosom 17 lokalisiert. Wahrscheinlich durch Genom-Duplikation verursacht findet man im Knochenfisch jeweils zwei Gene für Reggie-1 (re-1a, re-1b) und Reggie-2 (re-2a, re-2b), im Zebrafisch sind davon noch drei erhalten (re-1b, re-2a, re-2b). In allen weiteren daraufhin untersuchten Spezies wurde bislang nur ein Genlokus beschrieben [von Philipsborn *et al.* 2005].

### 1.3.1 Subzelluläre Lokalisation der Reggie-Proteine in Geweben und Zelllinien

Reggie-2 wird in einer Vielzahl von Säugetier-Zellen exprimiert, die Expressionsstärke variiert jedoch stark. Am höchsten ist sie im Gehirn, weniger stark im Herzen, der Lunge und der Plazenta, geringe Expression lässt sich im Pankreas und in der Leber nachweisen. Bezogen auf Zelllinien findet man Reggie-2 in Endothel-, Epithel-, vielen Tumorzelllinien und in glatter Muskulatur [Volonte *et al.* 1999, Liu *et al.* 2005]. Reggie-1 hingegen ist in fast allen Geweben bzw. Organen und in allen bisher untersuchten Zelllinien zu finden [Cho *et al.* 1995, Volonte *et al.* 1999].

Reggie-Proteine sind Raft-assoziiert, wobei die subzelluläre Lokalisation vom Zelltyp und dem Stadium der Differenzierung abhängt. Reggie-2 lokalisiert in undifferenzierten 3T3-Adipozyten hauptsächlich in zytoplasmatischen Vesikeln, während der Differenzierung findet eine Translokation zur Plasmamembran hin statt. Die vesikulären Strukturen konnten durch Verwendung geeigneter Marker

als späte Endosomen identifiziert werden [Liu *et al.* 2005], wobei die Lokalisation in endosomalen Kompartimenten auch in anderen Studien gezeigt werden konnte [Stürmer *et al.* 2001]. Die Membranständigkeit wird durch zwei hydrophobe Bereiche des Proteins und Palmitylierung des konservierten Cysteins Cys34 vermittelt [Morrow *et al.* 2002]. Bei Reggie-1 hingegen ist die Membranständigkeit durch Palmitylierung und Myristylierung bedingt [Neumann-Giesen *et al.* 2004], stark hydrophobe Bereiche fehlen hier.

In den meisten Zelltypen ist eine Kolokalisation der Reggie-Proteine mit GPI-verankerten Proteinen zu beobachten, was einen weiteren Hinweis auf die Raft-Assoziation dieser Proteine darstellt. Dies konnte zum Beispiel für Neuronen und Astrozyten dargestellt werden, in denen beide Reggie-Proteine mit Thy-1 und F3 kolokalisieren [Stürmer *et al.* 2001]. Immunfluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Plasmamembran von Neuronen Reggie-2 hauptsächlich im axonalen Bereich enthält, wohingegen somatodendritische Membranen kaum angefärbt werden [Kokubo *et al.* 2003]. In einigen Zelllinien ist Reggie-2 in detergenten-resistenten Mikrodomänen des Golgi-Apparates lokalisiert [Gkantiragas *et al.* 2001], in CHO-Zellen liegt das Protein fast ausschließlich in diesem Kompartiment lokalisiert vor. Da das Vorhandensein größerer, zusammenhängender Rafts lange kontrovers diskutiert wurde, ist bemerkenswert, dass Reggie-1 und Reggie-2 in nicht aktivierten T-Zellen in vormontierte Plattformen (PAP = *preassembled platforms*) mit einem Durchmesser von 5 bis 10  $\mu\text{m}$  integriert sind. Diese Plattformen lokalisieren an den Orten, an denen sich zwei Zellen nach der Zytokinese trennen, und stellen in aktivierten T-Zellen die sogenannten „cap“-Struktur dar [Harder *et al.* 1998, Rajendran *et al.* 2003]. Bei der Aktivierung der T-Zellen werden weitere Proteine in diese „Reggie-Rafts“ rekrutiert. In Vesikeln der T-Zelllinie Jurkat ist ausserdem eine Kolokalisation beider Reggie-Proteine mit dem zellulären Prionenprotein PrP<sub>c</sub> zu beobachten [Reuter *et al.* 2004]. Bei diesen Vesikeln handelt es sich nicht um Endosomen oder Lysosomen, sie sind jedoch reich an neutralen Lipiden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen deuten zusammen mit der Tatsache, dass die Vesikelmembran mit Synaptobrevin-1 angereichert ist, auf eine Exozytose dieser Vesikel hin.

In den meisten daraufhin untersuchten Zellen findet man beide Reggie-Proteine in ähnlichen Kompartimenten, wenn auch zu einem unterschiedlichen Gehalt. Ausnahmen bilden zum Beispiel Zentrosomen von PBMC, in denen Reggie-1, jedoch nicht Reggie-2 lokalisiert [Solomon *et al.* 2002]. Dahingegen wurde für Reggie-2 kürzlich eine Kernlokalisierung beschrieben, die von dem Zellzyklus-abhängigen, mitogenen Protein PTOV1 abhängt [Santamaria *et al.* 2005]. Des Weiteren wurde eine Lokalisation von Reggie-2 in der Phagosomenmembran beschrieben [Dermine *et al.* 2001].

### 1.3.2 Funktionelle Aspekte der Reggie-Proteine

Die physiologische Funktion der Reggie-Proteine ist noch nicht verstanden. Es existieren jedoch Hinweise, die den beiden Proteinen eine Rolle in Signal- und sekretorischen Prozessen zusprechen. Die ersten Arbeiten mit den Reggie-Proteinen deuteten auf eine Funktion bei der Regeneration und dem Wachstum von Axonen hin. Beide Proteine kolokalisieren in Neuronen mit den GPI-verankerten Proteinen Thy-1 und F3 und der src-Kinase fyn. Eine Aggregation von GPI-verankerten Proteinen durch Ligandenbindung oder Antikörper-Quervernetzung führt zu src-vermittelten Signalprozessen [Friedrichson *et al.* 1998, Harder *et al.* 1998]. Da bereits für T-Zellen vormontierte Mikrodomänen beschrieben wurden, die Reggie-Proteine enthalten und Signalmoleküle rekrutieren, könnte es sich hierbei um einen generellen Prozess handeln. So wurde zum Beispiel für Adipozyten gezeigt, dass Reggie-2 einen Komplex an die Plasmamembran rekrutiert, der einen alternativen, jedoch notwendigen Insulinsignalweg vermittelt [Baumann *et al.* 2000]. Die Glukose-Aufnahme der Zelle ist von der Insulin-Stimulation des Glukose-Transporters GLUT4 und dessen Translokation zur Plasmamembran abhängig. Dabei verläuft der Signalweg nach Aktivierung des Insulinrezeptors über die Kinasen PI3K und nachfolgend über Akt. Hinweise für einen PI3K-unabhängigen Weg ergaben sich aus der Tatsache, dass Aktivierung von PI3K durch manche Wachstumsfaktoren keine Translokation von GLUT4 zur Folge hat [Hay *et al.* 1997]. Baumann und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der alternative, PI3K-unabhängige Weg über die Phosphorylierung des Proteins cbl durch den Insulinrezeptor erfolgt. Cbl bildet zusammen mit CAP

(Cbl-assoziiertes Protein) und Reggie-2 einen Komplex, der durch letztgenanntes Protein zu Rafts der Plasmamembran rekrutiert wird. Dadurch kommt es zu der Translokation von GLUT4 an die Membran; der genaue molekulare Mechanismus ist allerdings noch unklar.

CAP gehört zusammen mit Vinexin  $\alpha$  und ArgBP2 zur Familie der SoHo-Proteine, denen eine sogenannte Sorbin-Homologie-Domäne gemein ist. Das Adaptorprotein ArgBP2 bildet in PC12 Zellen einen Komplex mit Cbl und der Tyrosinkinase Pyk2, der über eine weitere Bindung von ArgBP2 an Reggie-2 zu Rafts der Plasmamembran rekrutiert wird [Haglund *et al.* 2004]. Cbl und die Kinase Pyk2 werden hierbei mit der Regulation des Aktinzytoskeletts in Verbindung gebracht, da Überexpression dieser Proteine in PC12-Zellen zu einer veränderten Axonausbildung führt.

Reggie-2 wurde mit der Sortierung von Proteinen und der Exozytose über MVBs in Verbindung gebracht. Neben der bereits erwähnten Anwesenheit von Raft-Markern in exosomalen Strukturen von Retikulozyten (siehe Abschnitt 1.2.2) konnte das Protein in DRMs von Retikulozyten sowie in exosomalen Strukturen weiterer Zellen nachgewiesen werden [de Gassart *et al.* 2003].

Verschiedene Studien deuten auf eine mitogene Funktion von Reggie-Proteinen hin. Das mitogene Protein PTOV1 pendelt Zellzyklus-abhängig zwischen Zytoplasma und Kern, und ist in 71% aller Prostata-Karzinome überexprimiert. Eine Yeast two-hybrid-Analyse mit PTOV1 als Beuteprotein lieferte Reggie-2 als Interaktionspartner. Reggie-2 und PTOV1 kolokalisieren in der Prostata-Karzinom-Zelllinie PC-3 und können koimmunpräzipitiert werden. In Zellen, die ohne Serum kultiviert werden, ist PTOV1 im Zytoplasma lokalisiert, Reggie-2 ist kaum detektierbar. Sechs Stunden nach Serum-Stimulation der Zellen sind beide Proteine deutlich hochreguliert, und PTOV1 kolokalisiert mit Reggie-2 im Kern. Eine Herabregulierung von PTOV1 mittels siRNA führt zu einer verminderten Kernlokalisierung von Reggie-2, auf der anderen Seite hat eine Überexpression von Reggie-2 in diesen Zellen ebenfalls eine mitogene Wirkung, die durch die Herabregulierung von PTOV1 inhibiert wird [Santamaria *et al.* 2005]. Für Reggie-1 konnte eine Rolle in der Progression von Melanomen gezeigt werden, wobei anzumerken ist, dass dem in diesen Studien genutzten Reggie-1 N-terminal 50 Aminosäuren fehlten [Hazarika *et al.* 2004].

Die Lokalisation beider Reggie-Proteine in den PAP der Plasmamembran von T-Zellen lässt Rückschlüsse auf eine Funktion bei Signalwegen in T-Zellen zu [Solomon *et al.* 2002, Rajendran *et al.* 2003, Tu *et al.* 2004]. Die Überexpression von Reggie-1 verstärkte das Signal in den PAP und führte zur Ausbildung von Filopodien/Lamellipodien-ähnlichen Strukturen in Jurkat-Zellen. Letztere Beobachtung wurde auch in unserer Arbeitsgruppe bei Überexpression von Reggie-1 in verschiedenen Zelllinien gemacht [Neumann-Giesen *et al.* 2004]. Ebenfalls in die PAP lokalisiert nach Antikörper-Quervernetzung das zelluläre Prionenprotein PrP<sub>c</sub>. Die Aktivierung dieses Proteins führt zu einer Kolo-kalisation von Reggie-Proteinen, PrP<sub>c</sub> und verschiedenen Signalmolekülen wie Fyn, Lck und dem T-Zellrezeptor in den PAP. Nachfolgend kommt es zu einem Kalziumanstieg im Zytosol und zu F-Aktin-Polymerisation [Stürmer *et al.* 2004]. Die zelluläre Funktion von PrP<sub>c</sub> ist noch nicht bekannt, die Konformationsänderung von der physiologischen zur amyloiden Form PrP<sub>sc</sub> scheint jedoch in Rafts stattzufinden [Vey *et al.* 1996, Naslavsky *et al.* 1997]. Beide Reggie-Proteine sind im Gehirn reichlich vorhanden, und es konnte gezeigt werden, dass sie in den amyloiden Plaques von Alzheimer Patienten angereichert sind [Kokubo *et al.* 2000].

## 1.4 Das humane Immundefizienz Virus 1 (HIV-1) und Lipid Rafts

### 1.4.1 Das erworbene Immunschwäche Syndrom

Im Jahr 1981 wurde das amerikanische Zentrum für Krankheitskontrolle und -prävention (*Centers for Disease Control*, CDC) auf sich häufende Berichte über seltene und tödlich verlaufende Erkrankungen bei zuvor gesunden homosexuellen Männern aufmerksam [Centers for Disease Control 1982]. Gemein war den Erkrankungen eine erworbene Immunschwäche. Das zwei Jahre später entdeckte Humane Immundefizienz Virus 1 [Barre-Sinoussi *et al.* 1983, Gallo *et al.* 1984] gilt heute gemeinhin als kausales Agens für die als *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) bezeichnete Erkrankung.

Statistisch betrachtet waren im Jahr 2004 ca. 40 Millionen Menschen weltweit mit dem Virus infiziert, täglich kommen ca. 10000 Neuinfizierte hinzu [aktuelle

Übersicht: <http://www.unaids.org>]. Es existieren zwei Stämme des Virus, die sich auf der Ebene akzessorischer Gene voneinander unterscheiden. Die HIV-2-Epidemie ist weitgehend auf Westafrika beschränkt, während die weltweite HIV-Epidemie durch den Stamm HIV-1 verursacht wird.

Die Infektion mit HIV-1 und somit die Erkrankung AIDS führt nach individuell unterschiedlich langer Zeit immer zum Tod; zur Zeit sind keine Heilmittel oder Impfstoffe verfügbar. Wichtige Kriterien für den Verlauf der Erkrankung sind die Anzahl der nachweisbaren Viruspartikel, die sogenannte Viruslast, und Anzahl der CD4+ T-Zellen, welche den Status der körpereigenen Immunabwehr widerspiegeln.

### 1.4.2 Das humane Immundefizienz-Virus 1

Das Humane Immundefizienz Virus gehört zum Genus *Lentiviridae* innerhalb der Familie der Retroviren [Übersicht in Fields 2001]. Die infektiösen Partikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm bestehen aus einem Kapsid und einer Hüllmembran, die sich von der Wirtszellmembran ableitet. Das Genom besteht aus zwei 9,6 kbp großen Kopien einer Plusstrang-RNA, die mit Proteinen assoziiert vorliegt, jedoch bei der Transkription nicht direkt als mRNA fungieren kann. Am 5'- und 3'-Ende der RNA befinden sich sogenannte LTR-Regionen (*long terminal repeats*), die bei der Bildung viraler Genprodukte als starke Promotoren wirken; dazwischen befinden sich die Gene des HI-Virus, die für alle strukturellen und enzymatisch wirksamen Proteine kodieren. Des Weiteren befindet sich am 5'-Ende eine tRNA, die als Initiationspunkt der reversen Transkription dient.

Allen Retroviren gemein sind Gene für die Polyproteine Gag (Gruppen-spezifisches Antigen), Pol (Polymerase) und Env (Envelope) (siehe Abb. 1.1). Das pol-Gen kodiert die Reverse Transkriptase (p66), die die virale RNA in DNA transkribiert, eine Integrase (p32), welche die von der reversen Transkriptase synthetisierte DNA in das Wirtsgenom einbaut und eine Protease (p11), welche die hydrolytische Spaltung der viralen Polyproteine katalysiert und sich selbst von dem Polyprotein abtrennt. Das env-Gen kodiert ein Glykoprotein gp160, das durch die virale Protease in die transmembranären Oberflächenrezeptoren gp120



## Einleitung

und gp41 gespalten wird. Die Strukturproteine Matrix (MA, p17), Kapsid (CA, p24), Nukleokapsid (NC, p7), zwei kurze Spacerpeptide und p6 werden von dem gag-Gen kodiert. Zusätzlich codiert das HIV-Genom für sechs akzessorische Proteine, deren ursprünglich beschriebene Funktionen in Tabelle 1.1 aufgelistet sind.

rev (regulator of virion)	Stimulation der Expression viraler Strukturproteine. Erlaubt Export ungespleisster und teilweise ungespleisster Transkripte aus dem Nukleus
tat (transactivation of transcription)	Stimulation der LTR-vermittelten Produktion von viraler RNA
vif (virion infectivity factor)	Unterstützung der Bildung infektiöser HI-Viren
vpr (viral protein r)	Unterstützung der Bildung viruspezifischer Proteine, Anhalten des Zellzyklus
vpu (viral protein u)	Essentiell für die Virusreifung und Freisetzung
nef (negative factor)	Erhöht Virusreplikation in vivo und in vitro. Herabregulierung von CD4 und MHC Klasse II auf der Zelloberfläche

Tabelle 1.1: Akzessorische Proteine von HIV-1

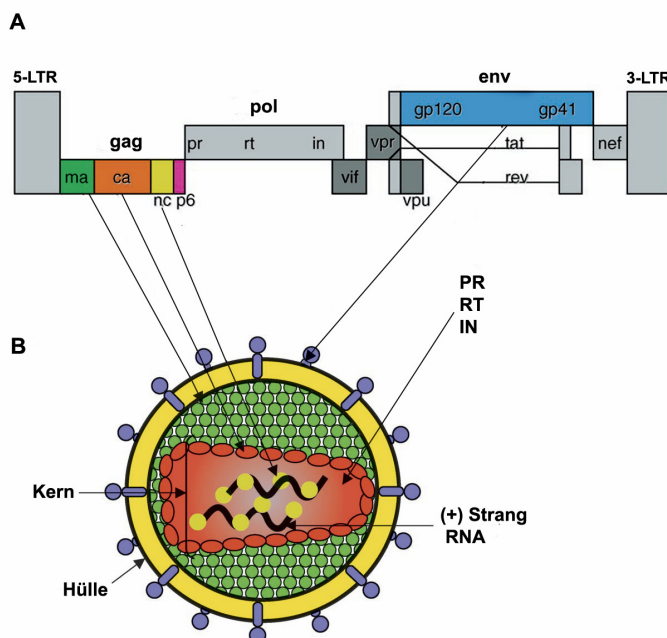


Abb. 1.1 Übersicht des Genoms und der Struktur von HIV-1

**A:** Das HIV-Genom besteht aus neun Genen, von denen gag, pol und env allen Retroviren gemein sind und Polyproteine codieren. **B:** Organisation eines reifen Partikels. Der RNA und Virus-Protein tragende Kern ist von einer Zellmembran umschlossen, in die virale Fusionsproteine eingelassen sind (Abbildung verändert nach Scarlata *et al.* 2003].

### 1.4.3 Replikationszyklus von HIV-1

Das Hüllprotein von HIV ist ein Dimer aus je einer gp120- und einer gp41-Untereinheit. Zunächst bindet das Virus mit seinem Oberflächenrezeptor gp120 an den CD4-Rezeptor einer Zielzelle [Matthews *et al.* 1987]. Infizierbar sind alle CD4+-Zellen wie T-Zellen, Makrophagen, Mikroglia-Zellen im zentralen Nervensystem und bestimmte Zellen des Gastrointestinaltraktes. Durch die Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor kommt es bei ersterem zu einer Konformationsänderung, die zur Bindung einer weiteren zellulären Komponente an gp120 führt. Bei diesen als Korezeptoren bezeichneten Komponenten handelt es sich hauptsächlich um die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 [Übersicht in Lu *et al.* 1997]. Die Bindung löst eine weitere Konformationsänderung sowohl in gp120 als auch in dem unterliegenden gp41 aus, die zu der Insertion eines Fusionspeptids in die Zellmembran führt, was letztlich in der Fusion von Virus- und Wirtsmembran resultiert. In einem weiteren, als *uncoating* (engl.: Enthüllung) bezeichneten Vorgang, werden das Virusgenom und die Proteine Integrase und Reverse Transkriptase aus dem Kapsid ins Zytoplasma entlassen (siehe Abbildung 1.2). Die Reverse Transkriptase synthetisiert aus der viralen RNA einen DNA-Doppelstrang, der durch das Enzym Integrase an zufälligen Stellen in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird; damit liegt das HI-Virus als sogenanntes Provirus vor. Die integrierte virale DNA kann nun von der humanen RNA-Polymerase II transkribiert werden, wobei die LTRs (long terminal repeats) als starke Promotoren wirken. Zwischen der Integration bis zur Produktion viraler Bestandteile kann ein Zeitraum von mehreren Jahren liegen. Wodurch diese sogenannte Latenzperiode beendet wird, ist noch nicht vollständig geklärt, man schreibt jedoch dem Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ -B eine Funktion bei der Auslösung produktiver Zyklen zu. Nach Beendigung der Latenzphase beginnt die Wirtszelle mit der Transkription viraler Gene, wobei die vom HIV-Genom kodierten Regulatorproteine und Wirt-spezifische Transkriptionsfaktoren an der Regulation beteiligt sind [Übersicht in Fields 2001]. Bei der Assemblierung neuer Partikel spielt Gag eine zentrale Rolle. Dieses Protein alleine ist ausreichend für die Produktion sogenannter virusähnlicher Partikel (VLP) in Abwesenheit aller anderen viralen Komponenten [Gheysen *et al.* 1989], des Weiteren ist Gag in die

Rekrutierung weiterer viraler Proteine wie den Vorläuferproteinen Pol und Env sowie zellulärer Faktoren involviert. Gag interagiert außerdem mit der genomischen viralen RNA, mit der es intermediäre Assemblierungs-Komplexe bildet. Diese werden als solche zur Membran transportiert, von der dann neue Partikel abschnüren. Der Vorgang, bei dem neue Partikel von der Wirtsmembran abschnüren, wird als *budding* (engl.: Knospung) bezeichnet. Die genauen molekularen Vorgänge des *buddings* sind noch nicht verstanden, das als "late-Domäne" (L-Domäne) bezeichnete Aminosäure-Motif PS/TAP in p6 spielt dabei jedoch eine entscheidende Rolle. Mutationen in der L-Domäne arrestieren das Virus in einem späten Stadium des Abschnürens an der Membran [Demirov *et al.* 2002]. Nach dem *budding* prozessiert die virale Protease die Vorläuferproteine Pol und Gag und schliesst damit die Bildung neuer infektiöser Partikel ab.

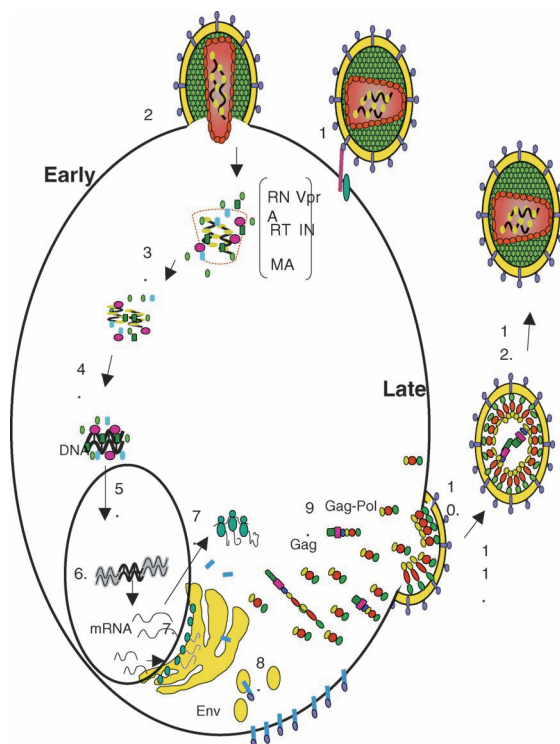


Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung des HIV-1-Replikationszyklus

Bei der Fusion mit der Zellmembran wird der Inhalt des Virus in die Zelle entlassen. Das virale Erbgut wird revers transkribiert und in das Wirtsgenom integriert. Nach einer Latenzphase werden HIV-Proteine exprimiert und neue Partikel assembliert (Abbildung aus Scarlata *et al.* 2003).

### 1.4.4 Virusassemblierung und Lipid Rafts

Die Assemblierung des HI-Virus umfasst mehrere Schritte, die durch Gag vermittelt werden. Damit Partikel gebildet werden können, müssen mehrere Gag-Moleküle durch Multimerisierung eine Gitterstruktur bilden, die später zur Hülle des Partikels wird. Die Matrix-Domäne p17 (MA) ist in den Transport zur Plasmamembran involviert, der C-terminale Anteil von p24 (CA) und der N-terminale Anteil von p7 (NC) vermitteln die Membranassoziation, und p6 ist für das *budding* der Partikel von der Membran notwendig. Da allein durch Expression von Gag VLP assemblieren und von der Membran abschnüren, müssen alle weiteren Komponenten, die für diesen Vorgang notwendig sind, zellulären Ursprungs sein und von Gag rekrutiert werden. Die Anwesenheit viraler RNA scheint den Vorgang zu beschleunigen [Morikawa *et al.* 1999], die Assemblierung ist ATP-abhängig [Lingappa *et al.* 1997] und das zelluläre ATP-bindende Protein HP68 ist für die Konformations-Konversion von Assemblierungs-Intermediaten in komplette Partikel notwendig [Zimmerman *et al.* 2002]. Die Identifikation sequenzieller Assemblierungs-Intermediate deutet dabei auf eine geordnete Abfolge des Zusammenbaus hin [Tritel und Resh 2000].

Die Membran von umhüllten Viren unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung von der durchschnittlichen Zusammensetzung der zellulären Plasmamembran, in der viralen Hülle sind beispielsweise Sphingolipide und Cholesterol angereichert [Renkonen *et al.* 1971, Pessin *et al.* 1980]. Dies trifft auch für HIV zu, und neuere Arbeiten zeigen, dass Lipid Rafts sowohl bei der Infektion als auch bei der Produktion neuer Partikel eine Rolle spielen [Aloia *et al.* 1993]. So ist zum Beispiel Cholesterol sowohl in der Plasmamembran als auch in der Virushülle für eine produktive Infektion notwendig [Liao *et al.* 2001 und 2003].

In CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, den überwiegenden Zielzellen der HIV-Infektion, findet die Assemblierung infektiöser Partikel an der Plasmamembran statt. Für diese Zellen konnte in einer Reihe von Studien gezeigt werden, dass das Abschnüren viraler Partikel in Rafts erfolgt. So findet sich Gag nach Triton X-100-Extraktion der Zellen in DRMs, und Cholesterol-Depletion der Zellen führt zu verminderter Virusproduktion und herabgesetzter Infektiosität der Partikel [Ono und Freed,

2001]. Das virale Protein nef erhöht die Cholesterolproduktion der Zelle und wird selbst durch Bindung an Cholesterol zu Lipid Rafts transportiert. Mutationen in der Cholesterol-Bindungsstelle in nef führen zu einer herabgesetzten Infektiösität der produzierten Viren [Zheng *et al.* 2003].

Des Weiteren ist die Myristylierung von Gag notwendig für eine effektive Partikelproduktion. Wird diese Lipidmodifikation verhindert, gelangt Gag zwar noch zur Plasmamembran, die Assemblierung ist allerdings stark reduziert [Lindwasser *et al.* 2002]. Eine in COS-1-Zellen exprimierte Gag-Myristylierungs-mutante zeigte auch, dass die Modifikation für die Multi-merisierung des Proteins notwendig ist [Bouamr *et al.* 2003].

### 1.4.5 Der Ort der Partikelproduktion ist Zelltyp-abhängig

Für eine effiziente HIV-Partikelproduktion ist die L-Domäne PS/TAP in p6 notwendig, ein Motiv, das sich auch in in anderen humanpathogenen Viren wie Ebola und HTLV-1 (humanes T-Zell-lymphotropes Virus 1) findet [Pornillos *et al.* 2002]. Gag bindet mit dieser L-Domäne an das humane Protein TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*) [Garrus *et al.* 2001, Martin-Serrano *et al.* 2001]. TSG101 wurde zunächst in Zusammenhang mit Brustkrebs beschrieben [Li *et al.* 1996], die Inaktivierung des Proteins führt zu Zelltransformation in Maus-Fibroblasten und zur Bildung metastasierender Tumore in Nacktmäusen [Li *et al.* 1996, Xie *et al.* 1998]. Neuere Studien zeigen, dass TSG101 in den Transport von Proteinen in multivesikuläre Endosomen oder *multivesicular bodies* (MVBs) involviert ist, und dass das Abschnüren von HI-Viren durch die Interaktion von Gag mit TSG101 nicht allein an der Plasmamembran erfolgt.

TSG101 gehört zum ESCRT-I-Komplex (siehe 1.2.2) und sortiert ubiquitinierte Cargo-Proteine in MVBs. Verantwortlich dafür zeigt sich die N-terminale Region von TSG101, die eine Ubiquitin-Konjugase E2-ähnliche Domäne enthält. Dieser Domäne fehlt zwar ein wichtiges Cystein, das im aktiven Zentrum anderer E2-Proteine enthalten ist, dennoch ist TSG101 in der Lage, Ubiquitin zu binden [Pornillos *et al.* 2003]. Die gleiche Funktion erfüllt das Protein HRS (*hepatocyte growth factor-related tyrosine kinase substrate*), das in das dem Zytoplasma zugewandten Blatt der Endosomen-Membran integriert ist und nicht zum ESCRT-

System gezählt wird. HRS interagiert mit TSG101 und rekrutiert so die zu sortierenden Cargo-Proteine zur Membran der MVBs. Da HRS ebenso wie Gag ein PS/TAP-Motiv besitzt, wird angenommen, dass HIV die ESCRT-Maschinerie benutzt, um infizierte Zellen zu verlassen [Clague und Urbe, 2003]. Entgegen früheren Annahmen findet die Ausschleusung von intakten viralen Partikeln nicht nur an der Plasmamembran infizierter Zellen statt, und für T-Zellen konnte gezeigt werden, dass nicht Gag, sondern das akzessorische Protein Vpu für die Plasmamembran-Assoziation notwendig ist. HIV-Stämme, die eine defekte Vpu-Variante exprimieren, schnüren in T-Zellen in endosomale Kompartimente ab [Klimkait *et al.* 1990, Gottlinger *et al.* 1993]. Tatsächlich ist es so, dass die Ausschleusung viraler Partikel Zelltyp-abhängig ist und beispielsweise in Makrophagen ausschliesslich über ESCRT-vermitteltes *budding* in MVBs erfolgt [Pelchen-Matthews *et al.* 2003].

### **1.5 Zielsetzung dieser Arbeit**

Im Rahmen dieser Studie sollte die Interaktion des Raft-Proteins Reggie-2 mit dem Struktur-Vorläuferprotein Gag des Humanen Immundefizienz Virus 1 charakterisiert werden. Neu identifizierte Interaktionen von zellulären mit viralen Proteinen geben dabei zum einen Aufschluß über den Replikationszyklus des Virus, zum anderen lassen sich Rückschlüsse auf Funktionen des zellulären Interaktionspartners ziehen. Dies ist im Fall von Reggie-2 von großem wissenschaftlichen Interesse, da die physiologische Funktion dieses Raft-Proteins bisher nicht bekannt ist.

Die Zielsetzung bestand im Einzelnen darin:

- 1) eine direkte Interaktion der beiden Proteine mit verschiedenen Methoden nachzuweisen
- 2) Bindedomänen der Interaktionspartner näher zu charakterisieren
- 3) Auswirkungen einer veränderten Expressionsstärke des Raft-Proteins auf Gag zu untersuchen und
- 4) Hinweise auf die physiologische Funktion von Reggie-2 zu erhalten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und spezielle Reagenzien

[ <sup>35</sup> S]-Methionin	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Biorad Protein Assay	Biorad, München
Dynabeads Protein A	Dynal, Oslo, Norwegen
Dynabeads Protein G	Dynal, Oslo, Norwegen
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Metafectene Transfektionsreagenz	Biontex, München
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Pansorbin Zellen	Calbiochem, Nottingham, England
Proteinase-Inhibitor-Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNAsin	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Vacutainer CPT System	BD Diagnostics, Heidelberg
SeaKem LE Agarose	Cambrex, Rockland Maine, USA
X-alpha-Gal	Glycosynth, Warrington, England

Alle hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen : Applichem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe).

#### Zellkultur

DMEM	Cambrex, Verviers, Belgien
Gibco™ RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
10 x Trypsin/EDTA	Cambrex, Verviers, Belgien

#### Standards

Precision Protein Standard (#161-0373)	Biorad, München
Mass Ruler DNA ladder mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

## 2.1.1 Antikörper

### Primäre Antikörper

Antikörper	WB	IP	IF	Fix	Referenz
<b>M α Flotillin-1</b>	1:500	-	1:25	MeOH	Transduction Labs, Lexington, USA
<b>M α ESA</b>	1:1000	-	1:25	MeOH	Transduction Labs, Lexington, USA
<b>R α FLAG-tag (F7425)</b>	1:1000	-	1:300	MeOH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<b>M α HIV-Gag (EF7)</b>	1:1000	-	1:300	MeOH	Holm <i>et al.</i> 2003
<b>G α HIV p24</b>	-	-	1:100	MeOH	DPC Biermann, Bad Nauheim
<b>M α TFN-Rezeptor</b>	1:1000	-	-	-	Zymed, San Francisco, USA
<b>R α TSG101</b>	-	-	1:100	MeOH	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
<b>M α HSV-Gc</b>	1:1000	-	-	-	Eis-Hubinger <i>et al.</i> 1991
<b>M α HA-tag</b>	1:1000	1:250	1:100	PFA/ MeOH	Covance, Princeton, USA
<b>M α myc-tag</b>	1:1000	-	1:500	PFA	Cell Signaling, Beverly, USA
<b>M α myc-tag SC-40</b>	-	1:100	-	-	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
<b>R α myc-tag SC-789</b>	-	1:250	-	-	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
<b>R α HIV-Capsid</b>	-	-	1:200	PFA	Welker <i>et al.</i> 2000
<b>S α HIV-Capsid</b>	-	1:100	-	-	Welker <i>et al.</i> 2000

(M = Maus, R = Kaninchen, S = Schaf, WB = Western Blot, IP = Immunpräzipitation, IF = Immunfluoreszenz, Fix = Fixierung, PFA = Paraformaldehyd, MeOH = Methanol)



*Sekundäre Antikörper*

Antikörper		Referenz
Goat à Mouse - HRP	1:10000 WB	Southern Biotechnologies, Birmingham, AL, USA
Goat à Rabbit - HRP	1:10000 WB	Zymed, San Francisco, USA
Goat à Mouse - Cy3	1:300 IF	Jackson Immunoresearch, USA
Goat à Mouse - Cy5	1:500 IF	Jackson Immunoresearch, USA
Goat à Rabbit - Cy3	1:300 IF	Jackson Immunoresearch, USA
Goat à Rabbit - DTAF	1:300 IF	Jackson Immunoresearch, USA
Donkey à Goat - FITC	1:300 IF	Jackson Immunoresearch, USA
Donkey à Goat - Cy3	1:300 IF	Jackson Immunoresearch, USA

(WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz)

## 2.1.2 Puffer und Lösungen

### *Puffer für Standard SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

<i>Trenngel</i>	10%	12,5%	<i>Sammelgel</i>	4%
30% Acrylamid/BIS	3,35 ml	4,18 ml	30% Acrylamid/BIS	850 µl
3 M Tris/HCl pH 8.8	1,25 ml	1,25 ml	3 M Tris/HCl pH 6.8	208 µl
20% SDS	50 µl	50 µl	20% SDS	25 µl
10% APS	100 µl	100 µl	10% APS	50 µl
TEMED	15 µl	16 µl	TEMED	8 µl
dd H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	ad 10 ml	dd H <sub>2</sub> O	ad 5 ml

1 x SDS Elektrophoresepuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris Base 0.1% SDS
1 x NuPaGE Elektrophoresepuffer	20x MOPS Puffer 25 ml Antioxidationsmittel 500 µl dd H <sub>2</sub> O ad 500 ml
1 x Probenpuffer	50 mM Tris/HCl pH 6.8 2% SDS 10% Glycerol 0.1% Bromphenolblau 30 mM DTT

**Puffer für Western Blot**

<b>Transferpuffer</b>		192 mM Glycin 25 mM Tris Base 20% Methanol
<b>Block-Lösung</b>		5% Magermilchpulver 1 x TBST
<b>HRP-Substrat</b>	<i>Lösung 1</i>	50 µl 250 mM Luminol 22 µl 90 mM p-Coumarinsäure 0,5 ml 1 M Tris, pH 8,5 4,5 ml H <sub>2</sub> O
	<i>Lösung 2</i>	6 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,5 ml 1 M Tris, pH 8,5 4,5 ml H <sub>2</sub> O

**Weitere Puffer**

PBS	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 5 mM NaCl
TBST	10 mM Tris, pH 8,0 100 mM NaCl 0.05 % Tween 20
LB medium	20 g LB Broth ad 1 l dd H <sub>2</sub> O
LB agar	15 g Agar ad 1 l LB medium
TAE	40 mM Tris-Acetat, pH 8.0 1 mM EDTA
Neufeld buffer	10 mM Tris, pH 8.5 0.6 M NaCl 0.1 % SDS 0.05 % NP-40
IMM	PBS 1 % Tx-100 0.5 % Na-Desoxycholát
IMM + KCl	IMM 2 M KCl
TNE buffer	25 mM Tris, pH 7.4 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % Tx-100
IP buffer	10 mM Tris, pH 8.0 0.15 M NaCl 5 mM EDTA 0.5 % Tx-100 60 mM N-Octylglucosid

Zell-Lysepuffer	50 mM Tris, pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % NP40
MBS buffer	25 mM Mes, pH 6.5 150 mM NaCl 60 mM N-Octylglucosid
Puffer für kompetente E. coli	Methode nach Hanahan [Hanahan 1985]

### 2.1.3 Bakterien-, Hefestämme und Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
E. coli XL1-blue	Bakterienstamm	Stratagene, Heidelberg
Ah 109	Hefestamm für Y2H	Clontech, Palo Alto, USA
HeLa	Humane Zervix Adenokarzinom Zelllinie	ATCC, Rockville, USA
Jurkat	T-lymphoblastische Zelllinie	ATCC, Rockville, USA
Primäre Lymphozyten	Spenderlymphozyten für Infektionsversuche	Inst. f. Exp. Hämatologie, Uniklinik Bonn

### 2.1.4 Kits und Enzyme

High fidelity PCR System Polymerase	Roche Applied Science, Mannheim
Shrimp alkaline Phosphatase	Roche Applied Science, Mannheim
T4 DNA Ligase	Roche Applied Science, Mannheim
Restriktionsenzyme	Roche Applied Science, Mannheim; MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Plasmid Mini-, Midi- Preparations-Kits	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose Gel Extraction Kit	Roche Applied Science, Mannheim
PCR Purification Kit	Roche Applied Science, Mannheim
AmpliScribe T7 High Yield Transcription kit	Epicentre technologies, Madison, USA
Reticulozyten Lysat	Promega, Madison, WI, USA
Thermoscript RT-PCR System	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

## 2.1.5 Desoxyoligonukleotide

	Primer Bezeichnung	Primer Sequenz 5' → 3'
1	Reg2-myc-1	GCTGGTGTCTAGCGGAGAGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAG GAGGACCTGAGCGGAACCATGGGGGC
2	Reg2-myc-2	GCCCCATGGTTCGCTCAGGTCCTCCTCTGAGATCAGCTT CTGCTCCTCTCCGCTAGACACCAGC
3	HA1-Reg2	GCGTAATCGGGGACGTCATAAGGGTAGGACCCTCCGCTAG ACACCAGCGTGATCTTATTGGCTGAGG
4	HA2-Reg2	TACCCTTATGACGTCCCCGATTACGCCGGGGGAGCGGAAC CATGGGGGCCGCCAAAGTTACTGGGG
5	BamHI-Stop328-Reg2	CTATAGGATCCTCAGGCCCTACGGCAAAGGCC
6	EcoRI-Reg2-Ala327	CTATAGAATTCATGGCCCGCTCGTGCTGAGGC
7	EcoRI-Reg2-K152fw	CTATAGAATTCATGAAGGACATTCACGATGACCAGG
8	BamHI-Stop-Reg2-F133	CTATAGGATTCTCAGAAAACCTGCTCTGAGAACTTC
9	BamHI-Stop-Reg2	CTATAGGATCCTCACGCCGTCCTTAAAGGCTTG
10	BamHI-Stop-Reg2-Arg253	CTATAGGATCCTCACCGCTGCTCCTCGATCTGCTGC
11	EcoRI-Reg2-Glu226-fw	CTATAGAATTCATGGAGGTCAACACCCGGCGAGCACAGG
12	EcoRI-Reg2-Start	CTATAGAATTCATGTTTTTCACTTGTGGCCC
13	BamHI-Reg2-Nonstop	CTATAGGATCCGCCCGTCCTTAAAGGCTTGTTG
14	Gag-fw	CTATAGAATTCATGGGTGCGAGAGCGTCAGTA
15	Gag-rev	CTATAGGATCCTTGTGACGAGGGGTCGTTGCC
16	Gag-p6-fw	CTATAGAATTCATGTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGC
17	Gag-p6-rev	CTATAGGATCCGTCGCTGCCAAAGAGTGATT
18	Gag-p17-fw	CTATAGAATTCATGGGTGCGAGAGCGTCAGTA
19	Gag-p17-rev	CTATAGGATCCGGGTAATTTTGGCTGACCTG
20	Gag-p24-fw	CTATAGAATTCATGTACCCTATAGTGCAAAACCTACA
21	Gag-p24-rev	CTATAGGATCCGCTTCAGCCAAAACCTTTGC
22	EcoRI-Reg-1-Start	CTATAGAATTCATGGGCAATTGCCACACGGTGGG
23	BamHI-Reg1-Stop	CTATAGGATCCTCACACCTGCGCACCAGTGCG

Alle Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, München synthetisiert, in aqua bidest zu einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst und bei -20°C gelagert.

## 2.1.6 Plasmide und cDNAs

pBluescript II SK(-)	Stratagene, La Jolla, USA
pcDNA3.1+	Invitrogen, Karlsruhe
pCMV5	Modifizierter pCMV1 Vektor
pEGFP N1 + N3	Clontech, Palo Alto, USA
pGADT7	Clontech, Palo Alto, USA
pGBKT7	Clontech, Palo Alto, USA
pTer <sup>+</sup>	Modifizierter pTer Vektor [van de Wetering <i>et al.</i> 2003]

## 2.2 DNA-Analyse

### 2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion, Restriktionsverdau und Ligation

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) oder Taq-Polymerase (MBI-Fermentas) verwendet. Die für das jeweilige Enzym optimalen Bedingungen wurden laut Herstellerangaben eingestellt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem 1%igen Gel aufgetrennt. Wenn nicht anders angegeben, wurde folgendes Standard PCR-Programm verwendet:

```
94°C 5'
94°C 30'' |
64°C 30'' | x30
72°C 1'   |
72°C 10'
```

Restriktionsverdaus wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (MBI-Fermentas, Roche). Zur Ligation wurde die T4-DNA-Ligase (Roche) verwendet. Für Klonierung verwendete verdaute Vektoren und DNA-Fragmente wurden entweder mittels *Agarose Gel DNA Extraction Kit* (Roche, Mannheim) aus dem Agarosegel eluiert oder mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim) aufgereinigt.

### 2.2.2 Klonierung von cDNA-Fragmenten

Zur Herstellung von Konstrukten wurde zunächst die cDNA und der Zielvektor mit adäquaten Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend über Nacht bei 16°C mittels T4-Ligase kovalent verknüpft. Die Plasmide wurden durch Hitzeschock in den *E. coli* Stamm XL1-blue transformiert und 1,5 Stunden in Flüssigkultur amplifiziert. Anschließend erfolgte eine Selektion von positiven Klonen auf LB-Agar Platten durch Verwendung der Antibiothika Ampicillin bzw. Kanamycin, abhängig von der Resistenz des jeweiligen Vektors.

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit dem *GenElute Plasmid Miniprep* (1,5 ml Kultur) bzw. *Midiprep Kit* (50 ml Kultur) nach Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) durchgeführt.

Alle hergestellten Konstrukte wurden mittels Sequenzanalyse (MWG Biotech, Ebersberg) überprüft.

## 2.3 Expressionskonstrukte

### 2.3.1 Herstellung von Reggie-Expressionsvektoren

Die verwendete Ratten Reggie-1 und Reggie-2 cDNA (Genebank AF023302 bzw. U60976) wurde von C. Stürmer zur Verfügung gestellt und lag im Vektor pBlueskript SK(-) (Stratagene, La Jolla, USA) vor [Lang *et al.* 1998].

Für Überexpressionsstudien wurden zunächst C- und N-terminal Epitop-markierte Reggie-2 Konstrukte hergestellt, die sich allerdings als unbrauchbar erwiesen, da die Lokalisation in der Zelle nicht mit der des endogenen Proteins übereinstimmte. Die Herstellung eines zwischen Ser-385 und Gly-386 mit einem HA-Epitop versehenen Reggie-2 wurde beschrieben [Morrow *et al.* 2002], zur Generierung der beiden Teilfragmente wurden die beiden Primerpaare 3/9 und 4/12 verwendet. Ein an gleicher Stelle mit einem myc-Epitop versehenen Reggie-2 Konstrukt wurde hergestellt, in dem zunächst mit den Primerpaaren 1/9 und 2/12 zwei Fragmente generiert und diese anschliessend mittels SOEING-PCR verbunden wurden [siehe Ho *et al.* 1989]. Das so generierte DNA-Fragment wurde anschliessend mit dem *EcoRI/BamHI*-geschnittenen Vektor pCMV5 ligiert.

Für Reggie-2 wurde im Bereich ab Arg331 ein ca. 50 Aminosäuren umfassende putative *coiled coil* Domäne beschrieben [Liu et al. 2005]. Das Konstrukt R2<sub>328-428</sub>, welches kurz vor dieser beschriebenen Domäne beginnt, wurde mit dem Primerpaar 8/12 hergestellt. Entsprechend wurde mit dem Primerpaar 5/12 die Deletionsmutante Reggie-2<sub>1-327</sub> generiert, die kurz vor diesem Bereich endet. Die in dieser Arbeit verwendeten Reggie-1 Konstrukte wurden freundlicherweise von C. Neumann-Giesen zur Verfügung gestellt.

### 2.3.2 HIV Gag Konstrukte

Aus einem R5-tropen HIV-Stamm, der 1986 im Institut für Medizinische Mikrobiologie in Bonn isoliert wurde, ist zunächst mit dem Primerpaar 14/15 die codierende Region des Polyprotein-Precursors Gag (p55) amplifiziert worden. Die Primerpaare 16/17, 18/19 und 20/21 wurden benutzt, um die entsprechenden Untereinheiten von p55 (p6, p17 und p24) zu generieren. Die entstandene cDNA wurde jeweils mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in die Y2H-Vektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert.

Ein Rev-unabhängiges Gag-EGFP-Konstrukt wurde freundlicherweise von M. Resh [Hermida-Matsumoto et al. 2000] zur Verfügung gestellt. Das Rev-unabhängige Konstrukt Gag-pcDNA wurde freundlicherweise von H. G. Kräusslich (Institut für Virologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

### 2.3.3 Konstrukte für Y2H

Zur Amplifizierung der DNA für das Yeast two-hybrid System wurden für Reggie-2 das Primerpaar 5/12 und für Reggie-1 das Primerpaar 22/23 benutzt. Die DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* verdaut und in die Zielvektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert. In nachfolgender Tabelle sind die Reggie-2 Teilfragmente aufgelistet, die für die Y2H-Analysen benutzt worden sind. Zur Vereinfachung werden Proteine, die aus dem Vektor pGADT7 resultieren, mit dem angehängten Kürzel AD beschrieben, mit BD entsprechend solche, die aus dem Vektor pGBKT7 resultieren.

Bezeichnung	Beschreibung
R2 AD / BD	Reggie-2, gesamte codierende Region
R2 <sub>1-253</sub> AD / BD	Reggie-2, Aminosäuren M1 - R253
R2 <sub>226-428</sub> AD / BD	Reggie-2, Aminosäuren E226 - A428
R2 <sub>152-428</sub> AD / BD	Reggie-2, Aminosäuren K152 - A428
R2 <sub>1-133</sub> AD / BD	Reggie-2, Aminosäuren M1 - K133
R2 <sub>328-428</sub> BD	Reggie-2, Aminosäuren G328 - A428
R2 <sub>1-327</sub> AD	Reggie-2, Aminosäuren M1 - V327
R1 AD / BD	Reggie-1, Aminosäuren M1 - V428
pGADT7-T	SV40 large T-antigen, Kontrollplasmid
pGBKT7-53	Maus-p53, Kontrollplasmid
pGBKT7-LAM	Humanes Lamin C, Kontrollplasmid

## 2.4 *In vitro* Studien

### 2.4.1 Yeast two-hybrid Analyse

Das Yeast two-hybrid System (Y2H) Matchmaker 3 wurde zur Untersuchung der Interaktion der Reggie-Proteine mit dem HIV Gag-Protein eingesetzt. Die Zusammensetzung der verwendeten Kultur-Medien, -Platten, Lösungen und Puffer sowie methodische Vorschriften zur Kultivierung, Lagerung und Analyse von Hefen wurden dem *Yeast Protocols Handbook* (Clontech) entnommen.

Das Prinzip der Methode beruht auf der Induktion von Reportergenen durch die Wechselwirkung zweier getrennter Domänen des Hefetranskriptionsfaktors Gal4. Die zu untersuchenden Proteine oder Proteinuntereinheiten wurden in zwei Vektoren kloniert, deren exprimiertes Produkt ein Fusionsprotein aus der Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) bzw. der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und dem Zielprotein darstellt. Kommt es zwischen den beiden Proteinen zu einer Interaktion, gelangen DNA-AD und BD in räumliche Nähe was die Aktivierung und Transkription der Reportergene zur Folge hat. Im verwendeten Hefestamm AH109 werden die Gene lacZ ( $\alpha$ -Galactosidase), his3 (Histidin) und ade2 (Adenin) unter Kontrolle bestimmter Gal4 *upstream activating sequences* (UAS) aktiviert. Durch Ausstreichen auf verschiedene Mangelnährböden können durch Verwendung dieser Reportergene positive Klone auf die Stärke der Interaktion



hin untersucht werden. Solche Klone mit stark interagierenden Proteinen sind in der Lage, auf einem 4 fach defizienten Medium (-4 = -Ade/-His/-Leu/-Trp) zu wachsen, solche mit schwächerer Interaktion wachsen auf 3 fach defizientem Medium (-3 = -His/-Leu/-Trp). Durch Zugabe von X-alpha-Gal (5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid) zu dem Nährboden kann die Stärke der Interaktion weiter bestimmt werden. Die Expression des Reportergens lacZ resultiert in der Hefe in einer funktionellen  $\alpha$ -Galactosidase, die normalerweise das Disaccharid Lactose in Galaktose und Glukose spaltet. Das synthetische Substrat X-alpha-Gal wird ebenfalls durch  $\alpha$ -Galactosidase gespalten, wodurch ein blauer Indigofarbstoff entsteht. Das Ausmaß der Blaufärbung lässt dabei Rückschlüsse auf die Stärke der Interaktion zu.

Für die Herstellung kompetenter Hefen wurde zunächst ein Anteil einer Übernachtskultur zu 300 ml YPDA-Medium (YPD + 0,003 % Adeninhemisulfat) gegeben, sodass bei 600 nm eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,2 bis 0,3 erreicht war. Diese Kultur wurde für 2-4 Stunden bei 30°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,5 erreicht war. Die Hefe wurde für 5 Minuten mit 1000 g bei Raumtemperatur pelletiert, mit TE-Puffer gewaschen und erneut pelletiert. Das Pellet wurde anschliessend in 1 ml frisch angesetztem 1xTE/1xLiAc-Puffer resuspendiert.

Pro Transformationsansatz wurden 100  $\mu$ l Hefesuspension mit 0,1  $\mu$ g Plasmid-DNA, 0,1 mg Heringssperma-DNA und 0,6 ml PEG/LiAc-Puffer durch vortexen gemischt und für 30 Minuten bei 30°C und 220 rpm im Schüttler inkubiert. Es folgte die Zugabe von 70  $\mu$ l DMSO, 15 minütige Inkubation bei 42°C und 2 minütiges Abkühlen auf Eis. Die Hefen wurden dann für 5 Sekunden mit 10000 g pelletiert, in 0,5 ml TE-Puffer resuspendiert und je 100  $\mu$ l auf -Leu/-Trp-Selektionsplatten ausplattiert. Das Wachstum der so für beide Plasmide positiv selektionierten Hefeklone erfolgte für 2-4 Tage bei 30°C im Brutschrank.

Positive Klone wurden gepickt und auf -3 und -4-X-alpha-Gal-Platten übertragen, um die Stärke der Interaktion zu bestimmen.

### 2.4.2 *In vitro* Transkription und Translation

Für Bindungsstudien wurden Reggie-2 und HIV-Gag bzw. Fragmente dieser Proteine *in vitro* transkribiert und translatiert. Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem *Ampliscribe T7 High Yield Transcription*-Kit (Epicentre technologies) nach Angaben des Herstellers. Die resultierende RNA wurde aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die *in vitro* Translation wurde mit dem *Rabbit Reticulocyte Lysate System* der Firma Promega durchgeführt. Eingesetzt wurden pro Ansatz 2  $\mu\text{g}$  RNA und 20  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin bzw. 20  $\mu\text{M}$  kaltes Methionin in einem finalen Volumen von 50  $\mu\text{l}$ . Der Translationsansatz wurde aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4.3 Bindungsstudien *in vitro* translaterter Proteine

Die Bindungsstudien erfolgten nach dem Prinzip der Koimmunpräzipitation. Da die für die Transkription benutzte DNA mittels Restriktionsverdau aus den Hefevektoren pGADT7 bzw. pGBKT7 gewonnen wurde, enthielten die zu untersuchenden Proteine ein HA- bzw. myc-Epitop. Für die Präzipitation wurden 4  $\mu\text{l}$   $\alpha$ -HA (Covance) oder  $\alpha$ -myc (Santa Cruz) Antikörper zunächst durch eineinhalbstündige Inkubation auf dem Drehrad bei Raumtemperatur an 30  $\mu\text{l}$  Protein-A- bzw. Protein-G-beads gekoppelt. Zeitgleich erfolgte eine 90 minütige Inkubation von je 10  $\mu\text{l}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-markiertem Protein mit einem kalten putativen Interaktionspartner in 500  $\mu\text{l}$  IP-Puffer auf Eis.

Nach der Kopplung der Antikörper an die Beads wurden diese 3 mal mit IP-Puffer gewaschen und anschliessend im Ausgangsvolumen von 30  $\mu\text{l}$  zu der Protein-Lösung gegeben. Eine weitere Inkubation der Antikörper-gekoppelten beads mit dem Proteingemisch erfolgte über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf dem Drehrad.

Am nächsten Tag wurden die Ansätze der Reihe nach mit je 1 ml Neufeld Puffer, IMM, IMM + KCl, 1x PBS und 0,1x PBS gewaschen und anschließend in 40  $\mu\text{l}$  Ladepuffer + 50 mM DTT für 5 Minuten aufgekocht, wodurch sich die Proteine von den Antikörpern lösten. Das Proteingemisch wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das resultierende Gel für 30 Minuten in 25%iger (v/v) Essigsäure fixiert und anschliessend für 2 Stunden bei  $80^{\circ}\text{C}$  im Vakuum auf ein

entsprechend großes Stück Papier aufgetrocknet. Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgte durch Auflegen und anschließende Entwicklung eines speziell für [<sup>35</sup>S]-Methionin optimierten Röntgenfilms für eine Woche.

### 2.4.4 HIV p24-ELISA

Ein quantitativer HIV-1 p24-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wurde mit einem Elecsys 2010-Analyseroboter der Firma Roche im Institut für Medizinische Mikrobiologie in Bonn zur Detektion Virus-ähnlicher Partikel durchgeführt. In den Test wurden pro Ansatz 100 µl Zelllysat oder Zellkultur-Medium eingesetzt. Die Handhabung des Tests erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

## 2.5 Zellkultur Studien

### 2.5.1 Kultur eukaryotischer Zelllinien

HeLa Zellen wurden in DMEM mit 10% (v/v) FCS bei 37°C mit 8% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz mit 0,25% (v/v) Trypsin/PBS vereinzelt und im Verhältnis 1/10 ausgesät. Jurkat Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% (v/v) FCS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.5.2 Transfektion

HeLa Zellen wurden zur transienten Expression von Proteinen unter Verwendung des Lipofektions-Reagenz Metafectene (Biontex, München) transfiziert. Transfiziert wurden in Sechslach-Platten ausgesäte Zellen mit einer Menge von 1 µg DNA und 4 µl Metafectene pro well für Einfachtransfektion und mit je 0,75 µg DNA und 6 µl Metafectene für Doppeltransfektionen. Die Analyse der Zellen erfolgte je nach verwendetem Konstrukt 24 - 48 Stunden nach Transfektion.

Die transiente Transfektion von Jurkat T-Zellen erfolgte mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers.

### **2.5.3 Immunfluoreszenz**

Kolokalisationsstudien mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden in HeLa- und Jurkat-Zellen sowie in primären Lymphozyten durchgeführt. Adhärenente Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät; für das Anfärben von transfizierten Zellen erfolgte die Aussaat 24 Stunden nach Transfektion. Das Anfärben von Suspensionszellen erfolgte auf Objektträgern, die zuvor mit 0,1% (w/v) Poly-D-Lysin beschichtet worden waren.

Die Zellen wurden zunächst in 1x PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit 3% (w/v) BSA/PBS geblockt. Fixiert wurde je nach verwendetem Primärantikörper entweder 5 Minuten mit 100% Methanol bei -20°C oder 20 Minuten mit 4% (v/v) Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur. Bei PFA-Fixierung erfolgte zusätzlich eine Permeabilisierung der Zellen mit 50 µg/ml Digitonin für 10 min.

Die Inkubation mit Erst- und Zweitantikörper erfolgte jeweils für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln, zwischen den Inkubationen wurde 3 mal 5 min mit 1x PBS gewaschen. Zur Einbettung der Zellen wurde ein Gemisch aus GelMount mit 50 mg/ml Dabco verwendet. Die anschließende Analyse erfolgte mit dem konfokalen Laserscanmikroskop LSM510 Meta (Zeiss).

### **2.5.4 Präparation Virus-ähnlicher Partikel (VLP)**

Das Medium von Gag-transfizierten Zellen wurde 3 Tage posttransfektion abgenommen und für 5 min bei 2750g zellfrei pelletiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt zur Aufreinigung für 15 min bei 20000g.

In einem Ultrazentrifugenröhrchen wurde 0,6 ml 20% (w/v) Saccharose/PBS mit 3,9 ml Medium überschichtet, der Ansatz wurde für 1,5 Stunden bei 4°C mit 100000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl Zellyse-Puffer resuspendiert. Nach halbstündiger Lyse wurden 30 µl des VLP-Lysats mit 10 µl 4x Ladepuffer versetzt und in einer NuPAGE aufgetrennt. Die

Analyse der Proben erfolgte nach Übertragen der Proteine auf Nitrocellulose mittels Westernblot.

### 2.5.5 Verminderung der Proteinexpression durch siRNA

Zur Herabregulierung von Proteinen mittels siRNA wurde der Vektor pTer+ verwendet. Die Methode wurde wie beschrieben durchgeführt [van de Wetering *et al.* 2003]. Nach der Klonierung der Reggie-1 bzw. Reggie-2 spezifischen *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide wurde der resultierende Vektor durch Sequenzanalyse überprüft. Die verwendeten Nukleotide sind nachstehend aufgeführt, die Reggie-spezifischen Sequenzen sind blau markiert:

	Primer	Primer Sequenz 5' → 3'
Reggie-1	R1B-sense	GATCCC <b>GATCATGACGGAGAAGGAG</b> TTCAAGAGACTCCTTCTCCGTCATGATCTTTTTGGAAA
	R1B-antisense	AGCTTTTCCAAAA <b>AGTCATGACGGAGAAGGAG</b> TCTCTTGAACTCCCTCTCCGTCATGATCGG
Reggie-2	R2A-sense	GATCCC <b>GGACATTCACGATGACCAG</b> TTCAAGAGACTGGTCATCGTGAATGTCCTTTTTGGAAA
	R2A-antisense	AGCTTTTCCAAAA <b>GGACATTCACGATGACCAG</b> TCTCTTGAACTGGTCATCGTGAATGTCCGG

### 2.5.6 Isolierung und Infektion primärer Lymphozyten

Die Isolierung von lebenden Zellen aus Blut wurde mit dem Vacutainer CPT System (BD Diagnostics) durchgeführt. Der Vacutainer ist ein spezielles Zentrifugationsröhrchen, das mit einem Natriumcitrat-Gel in einem Dichtegradienten gefüllt ist. Nach Zugabe von Vollblut und einer Zentrifugation bei 3000 g für 10 min kann die Fraktion der *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs), die hauptsächlich aus Mono- und Lymphozyten besteht, direkt entnommen werden. Die Zellen wurden zweimal in 5 ml RPMI1640-Medium resuspendiert und für 10 min mit 400 g pelletiert. Anschließend wurden die Zellen (entsprechend 20 ml Blut) in 6 ml 80% (v/v) RPMI1640 und 20% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) resuspendiert und je 3 ml auf zwei Zellkulturflaschen

verteilt. Weiterhin wurde zu den Kulturen Phythämagglutinin (PHA; 3 µg/ml) zugegeben. PHA regt spezifisch die CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten zur Proliferation an. Die Zugabe von Polybren (2 µg/ml) erfolgte, um die Virusproduktion in infizierten Zellen zu stimulieren. Am nächsten Tag wurde Interleukin-2 (IL-2; 200 Units/ml) zugesetzt. IL-2 aktiviert die Lymphozyten und regt sie zum Wachstum an. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37°C im Brutschrank mit 5 % CO<sub>2</sub> Begasung. Je nach Zelldichte erfolgte die Infektion der Zellen mit HIV 2-3 Tage nach Stimulierung mit IL-2.

Der zur Infektion verwendete Virusstamm wurde 1986 isoliert [Kasper *et al.* 1995]. Die Isolierung infektiöser HIV-Partikel aus dem Überstand infizierter primärer Lymphozyten erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die Isolierung virusähnlicher Partikel (siehe 2.5.5)

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Die verwendeten Puffer und Lösungen für die Standard SDS-PAGE sind in 2.1.2 angegeben.

Für das Auftrennen von Proteinen nach der VLP-Präparation oder Koimmunpräzipitation wurden NuPAGE-Novex Fertiggele der Firma Invitrogen eingesetzt, da dieses System zu einer schärferen Auftrennung führt. Verwendet wurden 4-12% Bis-Tris Gele mit MOPS Laufpuffer, die Handhabung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 2.6.2 Immunoblotting

Zum Nachweis von Proteinen wurden diese nach Auftrennung mittels SDS-PAGE im Nassblotverfahren auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde mit 300 mA bei maximal 220 Volt. Nach

dem Blot wurde die Membran eine halbe Stunde mit Block-Lösung inkubiert, um Protein-freie Stellen abzusättigen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, anschließend wurde der Blot dreimal für 5 Minuten in TBST gewaschen. Die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Die Detektion der Proteinbanden wurde nach dreimaligem Waschen des Blots mit HRP-Substrat durchgeführt, mit dem der Blot für eine Minute inkubiert wurde. Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgte durch Auflegen und anschließende Entwicklung eines Röntgenfilms für 10 Sekunden bis 10 Minuten, je nach verwendeten Antikörpern.

### 2.6.3 Koimmunpräzipitation

Für Präzipitations-Studien wurden transfizierte Zellen auf 6 oder 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und 2-3 Tage kultiviert, bis eine Konfluenz von 80-90 % erreicht war. Die Zellen wurden in 0,5 oder 1 ml Lysepuffer + 5 µl Proteaseinhibitor-Mix aufgenommen, resuspendiert und für eine halbe Stunde auf Eis lysiert. Anschließend erfolgte eine dreimalige Ultraschallbehandlung für jeweils 10 Sekunden. Die lysierten Zellen wurden 10 Minuten bei 25000 g pelletiert und der Überstand zweimal 15 Minuten mit gewaschenen Pansorbin-Zellen bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert.

Pro Ansatz wurden 30 µl gewaschene Protein-A oder Protein-G Magnetbeads in 1% (w/v) BSA/PBS mit 4 µl Antikörper für 2 Stunden auf dem Drehrad inkubiert. Die beads wurden anschließend zweimal mit TBST gewaschen, in 250 µl Lysepuffer aufgenommen und zu den jeweiligen Lysaten zugegeben. Die Präzipitation erfolgte dann über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad.

Zur Analyse der Proben wurden die beads sechsmal mit TBST und einmal mit 0,1x PBS gewaschen, in 70 µl 2x Ladepuffer + DTT aufgekocht und mittels NuPAGE aufgetrennt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Direkte Interaktion der Reggie-Proteine mit dem HIV Strukturprotein Gag

Viele virale Proteine werden als Vorläuferproteine exprimiert, die von viralen oder zellulären Proteasen gespalten werden. Das Rotavirus Vorläuferprotein VP5 enthält die Strukturproteine VP4 und VP8, wobei erstgenanntes ca. drei Stunden nach der Infektion in Lipid Rafts der betroffenen Zellen lokalisiert [Sapin *et al.* 2002]. In einem Kooperationsprojekt konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass VP4 in einem direkten Yeast two-hybrid Assay mit Reggie-2, nicht jedoch mit Reggie-1 interagiert. Da die Struktur von VP4 und die Art der Prozessierung der des HIV-1 Strukturproteins Gag ähnelt, welches ebenfalls in Lipid Rafts infizierter Zellen lokalisiert, sollte zu Beginn dieser Arbeit zunächst geprüft werden, ob eine Interaktion von Gag mit Reggie-Proteinen stattfindet.

#### 3.1.1 Yeast two-hybrid Analyse

Um eine mögliche direkte Interaktion der Reggie-Proteine mit HIV Gag zu untersuchen wurden Bindungsstudien durchgeführt. Eine Methode, um direkte Protein-Protein-Interaktion zu detektieren, ist das Yeast two-hybrid (Y2H) System. Es erlaubt die Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in intakten Zellen und gibt so Hinweise auf mögliche zelluläre Zusammenhänge. Das Prinzip gründet in der Zusammensetzung und Wirkung bestimmter eukaryotischer Transkriptionsfaktoren, die durch zwei physikalisch getrennte Domänen gekennzeichnet sind. Kommt es zu einer Interaktion zwischen zwei zu untersuchenden Proteinen, entsteht ein funktioneller Transkriptionsfaktor, der zur Expression von Reportergenen führt.

In Abbildung 3.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Reggie-2 Yeast two-hybrid-Konstrukte schematisch dargestellt. Für die Untersuchung von Reggie-1 wurde die komplette cDNA in beide Vektoren kloniert [Neumann-Giesen *et al.*



2004]. Die cDNA des Polyproteins Gag wurde ebenfalls in beide Vektoren kloniert, des Weiteren wurde die cDNA der Untereinheiten Matrix (MA, p17), Kapsid (CA, p24) und p6 verwendet (siehe Abb. 1.1).

Das Klonieren von cDNA in den Vektor pGADT7 führt zur Expression eines Fusionsproteins aus dem Zielprotein, einer N-terminal positionierten Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und einem HA-Epitop. Entsprechend erhält man mit dem Vektor pGBKT7 das Zielprotein mit Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) und einem myc-Epitop.

Mit den so erhaltenen Konstrukten wurde der Hefestamm Ah109 je nach zu untersuchender Interaktion doppelt transformiert. Durch Verwendung eines 2-fach Mangelnährbodens (-Leu/-Trp) konnten nach 3-4 Tagen zunächst solche Klone isoliert werden, die beide Plasmide exprimieren. Die Analyse der Hefelysate durch SDS-Page mit anschließendem Immunoblot bestätigte durch Verwendung von Antikörpern gegen die jeweiligen Epitope, dass die Proteine exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt).

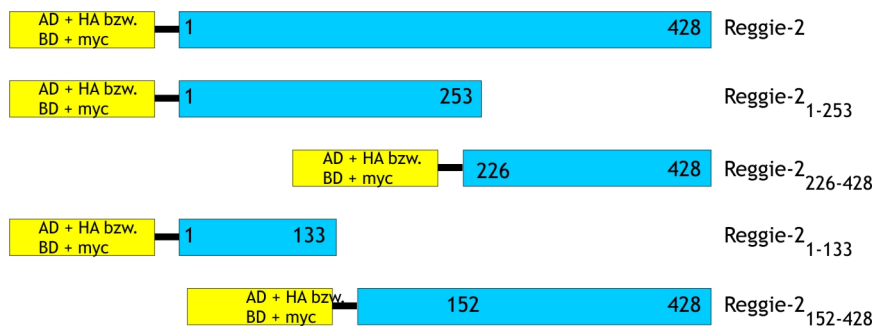


Abb. 3.1: Übersicht der verwendeten Reggie-2 Konstrukte für die Hefe-Interaktionsstudien. Jede verwendete cDNA wurde in beide Vektoren des Matchmaker Systems kloniert, sodass jeweils eine Variante N-terminal mit einem HA- oder einem myc-Epitop markiert war.

Zur Untersuchung der Interaktion und deren Stärke wurden die Klone anschließend auf weitere, Aminosäure-defiziente Nährböden (-3 = -Leu/-Trp/-His bzw. -4 = -Leu/-Trp/-His/-Ade) ausgestrichen, auf denen die Hefe nur dann wachsen kann, wenn eine Interaktion der beiden Proteine vorliegt. Zusätzlich waren die Nährböden mit der Substanz X-alpha-Gal versetzt. Mittels des Reportergens lacZ exprimiert die Hefe eine funktionelle  $\alpha$ -Galactosidase, welche

X-alpha-Gal zu einem blauen Indigofarbstoff umsetzt. Das Ausmaß der Blaufärbung lässt dabei Rückschlüsse auf die Stärke der Interaktion zu.

Eine Positivkontrolle erfolgte durch Kotransformation von p53-AD und large T-Antigen-BD, welche sehr stark miteinander interagieren. Diese Kontrolle war bei jeder Transformation positiv, was zeigte, dass das System funktioniert.

Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurde jeweils ein Interaktionspartner mit dem entsprechenden Leervektor kotransformiert. Eine Negativkontrolle war durch die Kotransformation von Zielproteinen im AD-Vektor mit pGBKT7-LAM gegeben. Dieses Plasmid codiert das humane intermediäre Filamentprotein Lamin C.

### 3.1.2 Reggie-Proteine bilden Homo- und Heteroligomere

Mittels Yeast two-hybrid Analyse konnte nachgewiesen werden, dass Reggie-Proteine oligomerisieren. Die Interaktion wird dabei überwiegend durch den C-Terminus des Proteins vermittelt, da sowohl Reggie-1 mit Reggie-1<sub>200-428</sub> als auch Reggie-1<sub>200-428</sub> mit Reggie-1<sub>200-428</sub> gleiche Interaktionsstärke zeigten [Neumann-Giesen *et al.* 2004]. Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Y2H-Analysen zur Untersuchung der Oligomerisierung auf Reggie-2 ausgedehnt. Bei diesem Protein ist die Interaktion ebenfalls über den C-Terminus vermittelt und unabhängig von der Gal4-Domäne.

Die Heterodimerisierung von Reggie-1 und Reggie-2 wird über den C-Terminus beider Proteine vermittelt. Dabei war die Interaktionsstärke, wenn nur die C-Termini beider Proteine verwendet wurden, weniger stark als bei Verwendung entweder beider Proteine in voller Länge oder nur eines C-Terminus in Verbindung mit dem kompletten Protein (siehe Abbildung 3.2 A). Dies deutet darauf hin, dass der C-Terminus beider Proteine nicht die komplette Interaktionsdomäne enthält; es kommt zu einer Bindung, die jedoch schwächer ist als bei Interaktion der Gesamtproteine.

### 3.1.3 Reggie-2 interagiert mit HIV-1 Gag im Yeast two-hybrid System

Zunächst konnte bestätigt werden, dass das Gag-Protein in der Lage ist, weitere Gag-Moleküle zu binden; tatsächlich handelt es sich um eine Multimerisation [Colgan *et al.* 1996]. Eine sehr starke Interaktion zeigte sich zwischen Reggie-2 und Gag, wobei es keine Rolle spielte, ob eines der jeweiligen Proteine als Fusionsprotein mit Gal4-AD oder Gal4-BD exprimiert wurde. Auffällig war, dass im Y2H-System keine Interaktion von Reggie-1 mit Gag gezeigt werden konnte, obwohl die beiden Reggie-Proteine zu ca. 47% identisch und zu ca. 70% sequenzhomolog sind. Dies deutet auf unterschiedliche physiologische Funktionen dieser hochkonservierten Proteinfamilie hin und spricht für die Spezifität der Interaktion zwischen Reggie-2 und Gag.

Bezüglich der verwendeten Gag-Untereinheiten zeigte sich, dass die Interaktion von Reggie-2 mit p24 am stärksten und vergleichbar der Interaktion mit Gag war, allerdings nur dann, wenn Reggie-2 als Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne exprimiert wurde. Die unterschiedlich starke Interaktion von Reggie-2 mit HIV p24, je nachdem welches der Proteine durch welchen Vektor exprimiert wurde, könnte in der unterschiedlichen Konformation durch die Epitop-Markierung der Proteine begründet sein. Bei Verwendung von Reggie-2 in pGBKT7 war die Interaktion schwächer, aber immer noch signifikant und vergleichbar mit der Interaktion von Reggie-2 mit p6. Zwischen Reggie-2 und p17 konnte keine Interaktion festgestellt werden.

Um die Bindungsstelle von Reggie-2 an Gag einzugrenzen, wurden Deletionsmutanten von Reggie-2 verwendet (siehe Abbildung 3.1). Dabei zeigte sich, dass die Interaktion zwischen Gag und Reggie-2 durch dessen C-Terminus vermittelt zu werden scheint, obgleich keine Interaktion mit dem Konstrukt Reggie-2<sub>152-428</sub> detektiert wurde. Das Konstrukt Reggie-2<sub>1-133</sub> führte zu einer Autoaktivierung und wurde nicht weiter verwendet.

A

pGADT7		Reggie-2	Reggie-2 226-428	Reggie-2 1-253	Reggie-2 152-428	BD	Reggie-1	Reggie-1 200-428	Reggie-1 1-233
pGBKT7	Reggie-2	Starke Interaktion	Starke Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Starke Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion
	Reggie-2 <sub>226-428</sub>	Starke Interaktion	Starke Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Starke Interaktion	Schwache Interaktion	Keine Interaktion
	Reggie-2 <sub>1-253</sub>	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion
	Reggie-2 <sub>152-428</sub>	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion
	AD	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion
	Reggie-1	Starke Interaktion	Starke Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Starke Interaktion	Keine Interaktion
	Reggie-1 <sub>200-428</sub>	Starke Interaktion	Schwache Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Starke Interaktion	Keine Interaktion
	Reggie-1 <sub>1-233</sub>	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion
	Reggie-1 <sub>1-233</sub>	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion

Starke Interaktion
Schwache Interaktion
Keine Interaktion
Nicht getestet

B

pGADT7		Gag	p6	p17	p24	BD	Reggie-2	Reggie-1
pGBKT7	Gag	Starke Interaktion	Schwache Interaktion	Schwache Interaktion	Schwache Interaktion	Keine Interaktion	Starke Interaktion	Keine Interaktion
	p6	Schwache Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Schwache Interaktion	Keine Interaktion
	p17	Schwache Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion
	p24	Schwache Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Schwache Interaktion	Keine Interaktion
	AD	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion
	Reggie-2	Starke Interaktion	Schwache Interaktion	Keine Interaktion	Starke Interaktion	Keine Interaktion	Starke Interaktion	Starke Interaktion
	Reggie-1	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Starke Interaktion	Starke Interaktion
	Reggie-2 <sub>226-428</sub>	Starke Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion
	Reggie-2 <sub>152-428</sub>	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion
	Reggie-2 <sub>1-253</sub>	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion	Keine Interaktion

Starke Interaktion
Schwache Interaktion
Keine Interaktion
Nicht getestet

C

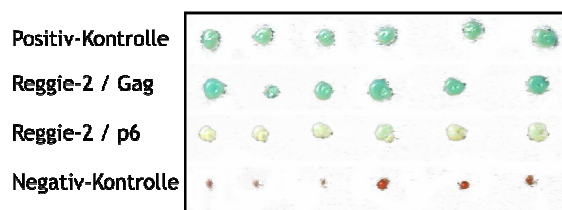


Abb. 3.2: Übersicht der getesteten Y2H-Interaktionen von Reggie-Proteinen und HIV Gag; die angegebene Stärke der Interaktion bezieht sich auf die Fähigkeit des jeweils doppelt transformierten Hefestamms Ah109, auf einem vierfach defizienten Mangelnährboden zu wachsen. Als Negativkontrolle wurde ein Konstrukt zusammen mit dem entsprechenden Leervektor oder mit dem Kontrollvektor pGBKT7-Lam transformiert. A: Übersicht der Reggie-Dimerisierung. B: Reggie-2, jedoch nicht Reggie-1, interagiert mit HIV-1 Gag. Die Interaktion wird über den C-Terminus von Reggie-2 vermittelt. Eine starke Interaktion zeigte sich für Reggie-2 mit Gag und der p24-Untereinheit, p6 interagiert schwach, p17 gar nicht mit Reggie-2 C: Exemplarische Darstellung der Interaktionsstärke auf einem vierfach defizienten X-alpha-Gal Mangelnährboden.

### 3.1.4 *In vitro* Bindungs-Studien

Um die Ergebnisse der Yeast two-hybrid Studien zu verifizieren, wurde ein System gewählt, das es erlaubt, direkte Interaktionen zwischen Proteinen zellfrei zu untersuchen. Dazu wurden die benutzten Y2H-Konstrukte *in vitro* transkribiert und translatiert. Die jeweilige HA- oder myc-Markierung der Proteine blieb dabei nach der Translation erhalten, die Gal4-Aktivierungs- oder DNA-Binde-Domänen wurde nicht translatiert.

Die Kontrolle der Expression erfolgte für die [<sup>35</sup>S]-markierten Proteine durch Autoradiographie nach SDS-Page und Trocknung des Gels, für die kalt translatierten Proteine durch Antikörperfärbung nach Western Blot (nicht gezeigt). Alle *in vitro* translatierten Protein zeigten das erwartete Molekulargewicht.



Abb. 3.3 Übersicht der verwendeten Reggie-2 Konstrukte für die *in vitro* Bindungsstudien. Die translatierten Proteine enthielten N-terminal entweder eine HA- oder eine myc-Epitop-Markierung.

Zur Untersuchung der Interaktion wurde ein [<sup>35</sup>S]-markiertes Protein mit einem kalt translatierten Protein inkubiert. Anschliessend wurde eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen die HA- oder myc-Markierung des jeweiligen kalten Translationsprodukts durchgeführt. Kam es zu einer Interaktion, wurde das radioaktiv markierte Protein koimmunpräzipitiert, was als Bande im Autoradiogramm des getrockneten Gels nach Röntgenfilmexposition sichtbar war. In Abbildung 3.4 ist gezeigt, dass *in vitro* translatiertes Reggie-2 bzw. HIV Gag in der Lage sind, sich gegenseitig zu kopräzipitieren. Die Kontrollen, in denen nur radioaktiv markiertes Protein mit Antikörper inkubiert

## Ergebnisse

wurde, zeigen, dass die Interaktion spezifisch ist und somit eine direkte Interaktion der Proteine stattfindet.

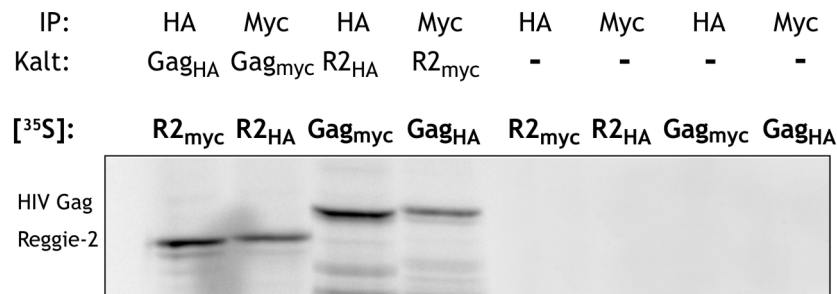


Abb. 3.4: Autoradiogramm der Koimmunpräzipitation *in vitro* translaterter Proteine. Die verwendete cDNA enthielt jeweils die Sequenz für ein HA- oder myc-Epitop. Der Antikörper der für die Präzipitation genutzt wurde war jeweils gegen ein Epitop des kalten Interaktionspartners gerichtet, sodass nur dann ein Signal sichtbar ist, wenn das [<sup>35</sup>S]-markierte Protein kopräzipitiert wurde. Es konnte sowohl Gag mit Reggie-2 als auch Reggie-2 mit Gag kopräzipitiert werden.

Um die Interaktions-Domäne näher zu charakterisieren, wurden Deletionsmutanten von Reggie-2 *in vitro* translatiert und für die Bindungsstudien eingesetzt. Zusätzlich zu den schon für die Hefestudien verwendeten cDNAs wurden zwei weitere Reggie-2-Mutanten kloniert. Reggie-2<sub>1-327</sub> ist ein N-terminales Fragment, welches nach Aminosäureposition V327 endet. Bei Reggie-2<sub>328-428</sub> handelt es sich um ein C-terminales Fragment, das mit Aminosäure G328 beginnt. Diese beiden Konstrukte wurden hergestellt, da im Verlauf dieser Arbeit eine Publikation erschien, die in einem ca. 50 Aminosäuren umfassenden Bereich ab A331 eine putative *coiled coil* -Domäne (engl.: gewundene Spirale) vorhersagt [Liu *et al.* 2005]. *Coiled coils* bestehen aus zwei oder mehr  $\alpha$ -Helices, die umeinander gewunden sind. Trotz dieser einfachen Struktur sind sie in der Lage, hoch spezifische Wechselwirkungen zu vermitteln.

Es zeigte sich, dass die Dimerisierungs-Domäne von Reggie-2 in dessen C-Terminus lokalisiert ist. Reggie-2 kopräzipitierte sowohl das Gesamtprotein als auch das C-terminale Fragment annähernd gleich stark. Dabei spielte es keine Rolle, ob Reggie-2 oder Reggie-2<sub>226-428</sub> an den Antikörper gebunden war (siehe Abbildung 3.5 A). Überraschend war die stärkere Bindung von Reggie-2 an Reggie-2<sub>1-327</sub>, hierfür könnte konformationsbedingt eine verlangsamte Dissoziation der Proteine verantwortlich sein. Reggie-2<sub>328-428</sub> konnte das

## Ergebnisse

Gesamtprotein nur dann binden, wenn die Präzipitation mit einem Antikörper gegen das myc-Epitop des nicht-radioaktiven Fragments durchgeführt wurde.

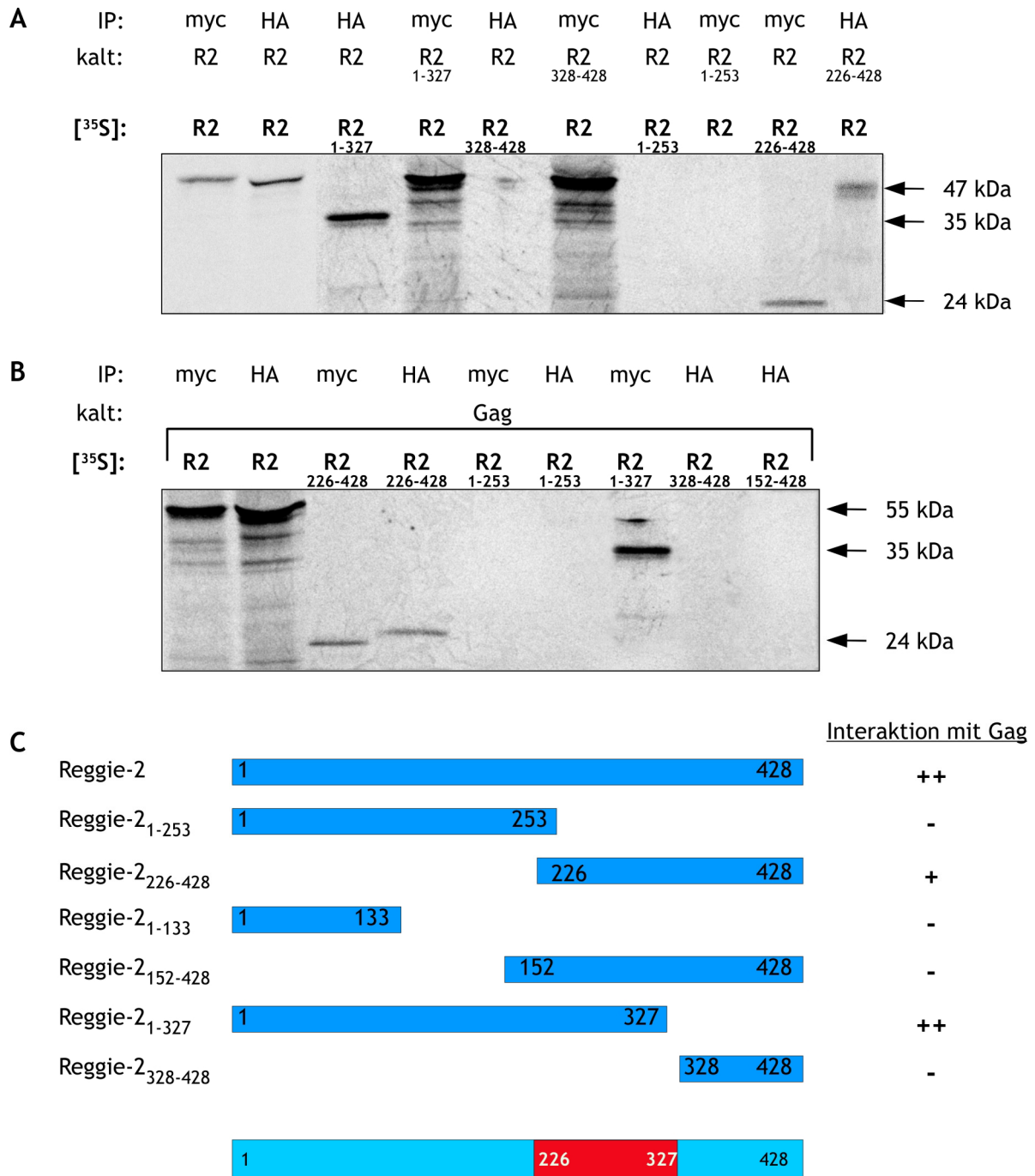


Abb. 3.5: Autoradiogramm der Koimmunpräzipitation *in vitro* translaterter Proteine. **A:** Reggie-2 bildet Homooligomere, die Bindung erfolgt dabei über den C-Terminus des Proteins. Reggie-2 präzipitiert mit Reggie-2<sub>226-428</sub> und Reggie-2<sub>1-327</sub>, nicht jedoch mit dem N-terminalen Fragment des Proteins. **B:** Reggie-2 bindet HIV-Gag, die Bindung erfolgt dabei über einen C-terminalen Bereich des Reggie-Proteins zwischen den Aminosäuren E226 und V327. **C:** Schematische Darstellung der Interaktionsdomäne. Reggie-2 bindet sowohl Reggie-2 als auch Gag in einem Bereich zwischen den Aminosäuren E226 und V327.

War hingegen das Fragment [<sup>35</sup>S]-markiert, konnte es nicht von HA-Antikörper gebundenem Reggie-2 präzipitiert werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine unspezifische Interaktion der isolierten *coiled coil*-Domäne hin. Da sowohl Reggie-2<sub>226-428</sub> als auch Reggie-2<sub>1-327</sub> das Gesamtprotein in beiden experimentellen Ansätzen banden, kann hier von einem falsch positiven Ergebnis ausgegangen werden. Eine Bindung von Reggie-2<sub>1-253</sub> an Reggie-2 konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Ergebnissen der Yeast two-hybrid Analyse.

Die Bindungsstudien von HIV Gag mit Reggie-2 führte zu ähnlichen Ergebnissen. Sowohl Reggie-2 als auch Reggie-2<sub>1-327</sub> binden Gag gleich stark. Eine schwächere, aber ebenfalls deutliche Interaktion zeigte sich zwischen dem viralen Protein und Reggie-2<sub>226-428</sub>. Reggie-2<sub>328-428</sub> und Reggie-2<sub>1-253</sub> sind nicht in der Lage, Gag zu binden (siehe Abbildung 3.5 B). Die Analyse der Interaktion ergab, dass sowohl die Dimerisierung von Reggie-2 als auch dessen Interaktion mit HIV Gag in einem Bereich zwischen den Aminosäuren E226 bis V327 liegt (siehe Abbildung 3.5 C). Interessanterweise konnte keine Interaktion von Reggie-2<sub>152-428</sub> mit Gag oder Reggie-2 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis könnte durch eine Missfaltung der exprimierten Deletionsmutante zustande kommen. Im Vergleich zu Proteinen mit Punktmutationen durch Aminosäureaustausch ist bei Deletionsmutanten die Wahrscheinlichkeit, dass sich das Expressionsprodukt unvollständig oder falsch faltet, wesentlich erhöht.

### **3.2 Expression Epitop-markierter Reggie-2 Varianten in Säugerzellen**

Die erhältlichen Reggie-2 spezifischen Antikörper sind für bestimmte Studien, wie z.B. Antikörper-Markierung in PFA-fixierten Zellen, ungeeignet. Daher wurde Epitop-markiertes Reggie-2 hergestellt. Zunächst wurden Reggie-2-GFP Konstrukte hergestellt, die jedoch nicht verwertbar waren. In Immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass das GFP-markierte Reggie-2 in großem Mass aggregiert, unabhängig davon, ob GFP C- oder N-terminal an Reggie-2 fusioniert wurde. Ähnliche Resultate zeigten sich



bei Markierung des C- oder N-Terminus mit einem HA- oder myc-Epitop. Morrow *et al.* haben ein Reggie-2 Protein generieren können, das eine HA-Markierung innerhalb der Proteinsequenz trägt und dessen Lokalisation der des endogenen Proteins entspricht [Morrow *et al.* 2002].

Da kommerziell verfügbare Antikörper gegen das myc-Epitop sowohl in biochemischen Methoden als auch in der Mikroskopie bessere Resultate zeigen als  $\alpha$ -HA Antikörper, wurde zusätzlich zu Reggie-2-HA noch ein mit myc-Epitop versehenes Reggie-2 hergestellt. Das Epitop befindet sich bei dieser Variante, wie bei Morrow *et al.* beschrieben, an gleicher Stelle zwischen den Aminosäuren S385 und G386 (siehe Abbildung 3.6).

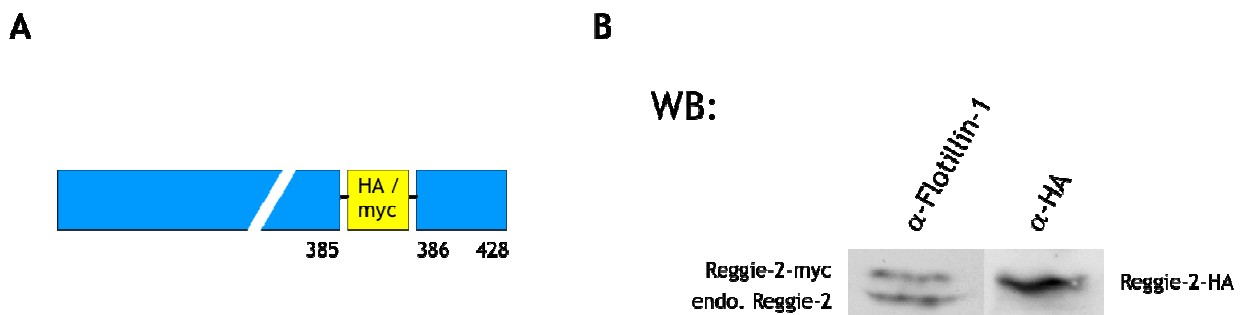


Abb. 3.6: Epitop-markierte Varianten von Reggie-2. **A:** Ein HA- bzw. ein myc-Epitop wurde zwischen den Aminosäuren S385 und G386 in die Ratten-Reggie-2 Sequenz eingefügt. **B:** HeLa Zellen, welche die Reggie-2 Varianten Reggie-2-HA und Reggie-2-myc transient exprimierten, wurden lysiert und das markierte Reggie-2 nach Immunoblotting mit Antikörpern gegen Reggie-2 oder das jeweilige Epitop sichtbar gemacht.

### 3.3 Reggie-2 und HIV-1 Gag kolokalisieren in Säugerzellen

#### 3.3.1 Reggie-2 zeigt unterschiedliche Lokalisation in verschiedenen Zelltypen

Die Reggie-Proteine wurden zunächst als Plasmamembran-assoziierte Proteine beschrieben [Lang *et al.* 1998]. Spätere Arbeiten zeigten, dass auch Endosomen Reggie-Proteine tragen und dass die Plasmamembran-Lokalisation nicht mit der von Caveolae übereinstimmt [Stürmer *et al.* 2001]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von Reggie-2 Zelltyp-spezifisch ist.

Verschiedene Zelllinien und primäre Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz auf Reggie-2 Lokalisation hin untersucht.

In Abbildung 3.7 ist die Lokalisation von Reggie-2 in verschiedenen Zelllinien dargestellt. Die Keratinozyten-Zelllinie Hacat (Abb. 3.7 A) und J774-Makrophagen (Abb. 3.7 B) zeigten hauptsächlich eine intrazelluläre, vesikuläre Lokalisation, die Häufigkeit der Vesikel ist dabei in Makrophagen geringer. Für die in Abbildung 3.7 B dargestellten Makrophagen wurden die Zellen zur Sichtbarmachung der Plasmamembran zusätzlich mit einem Antikörper gegen CD14 gefärbt. CD14, ein Oberflächenrezeptor für einen Komplex aus Lipopolysacchariden (LPS) und LPS-bindenden Proteinen, wird in Makrophagen und Monozyten stark exprimiert. Im Gegensatz zu dieser intrazellulären Lokalisation liegt Reggie-2 in primären Lymphozyten (Abb. 3.7 C) und der T-Zelllinie Jurkat (nicht gezeigt) überwiegend an der Plasmamembran vor. Das Protein ist in der sogenannten „Cap“-Struktur aktivierter T-Zellen stark konzentriert [Rajendran *et al.* 2003].

Die Darmepithel-Zelllinie Caco2 (Abb. 3.7 D) zeigt eine sowohl vesikuläre als auch Plasmamembran-ständige Lokalisation, die mit der in HeLa-Zellen (Zelllinie eines humanen Gebärmutterkarzinoms) vergleichbar ist (Abbildung 3.8 B + C).

In der Arbeitsgruppe von Rosanna Paciucci konnte gezeigt werden, dass Reggie-2 auch im Kern vorliegen kann [Santamaria *et al.* 2005]. Diese Beobachtung konnte für die Nierenepithel-Zelllinie MDCK bestätigt werden, in der Reggie-2, wahrscheinlich Zellzyklus-abhängig, entweder im Kern oder vesikulär / membranständig vorliegt (Abbildung 3.7 E + F).

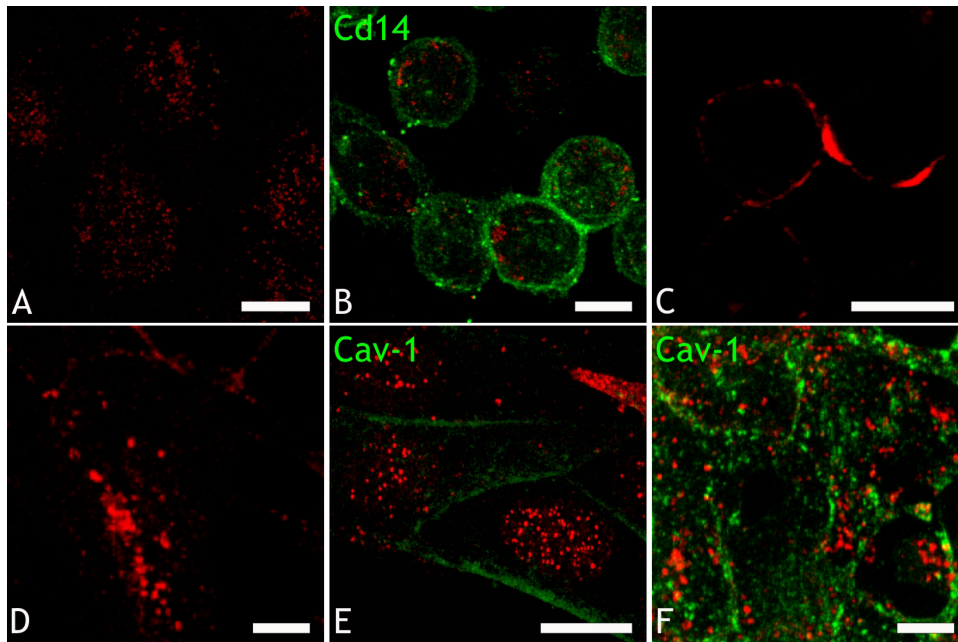


Abb. 3.7: Lokalisation von Reggie-2 in verschiedenen Zelltypen.

Die Detektion von Reggie-2 (rot) erfolgte mit  $\alpha$ -Flotillin Antikörper. Falls nötig, wurde zur Markierung der Plasmamembran CD14 bzw. Caveolin-1 (grün) angefärbt. In Hacat-Zellen (A) und J774-Maus-Makrophagen (B) zeigt Reggie-2 überwiegend intrazelluläre, vesikuläre Lokalisation. Primäre Lymphozyten (C) zeigen eine ausschließlich Plasmamembran-ständige Lokalisation, wohingegen das Protein in Caco2-Zellen (D) sowohl an der Plasmamembran als auch intrazellulär lokalisiert ist. In der Epithel-Zelllinie MDCK (E+F) liegt Reggie-2, wahrscheinlich Zellzyklus-abhängig, entweder im Kern oder vesikulär vor mit geringem Anteil an der Plasmamembran vor. Massbalken 10  $\mu$ m.

### 3.3.2 Endogene Reggie-Proteine kolokalisieren mit HIV-1 Gag-EGFP in HeLa-Zellen

Die Ergebnisse der Bindungsstudien sollten durch mikroskopische Analysen bestätigt werden. Ein EGFP-markiertes Gag-Protein wurde in HeLa-Zellen exprimiert und auf Kolokalisation mit Reggie-Proteinen hin untersucht. Der Nachweis der Reggie-Proteine erfolgte mittels Antikörpermarkierung. Das Gag-Protein ist in HeLa-Zellen vornehmlich in intrazellulären vesikulären Strukturen zu finden, eine Anfärbung der Plasmamembran ist jedoch auch deutlich sichtbar. Die Vesikel sind dabei nicht gleichmässig verteilt sondern in bestimmten Bereichen der Zellen angereichert. Im Gegensatz dazu zeigen primäre Lymphozyten überwiegend eine Anfärbung der Plasmamembran (vergleiche Abb. 3.7 B). Reggie-1 ist in HeLa-Zellen hauptsächlich Plasmamembran-ständig und

zeigt keine signifikante Kolo­kalisierung mit Gag. Dies bestätigte die Ergebnisse der Bindungsstudien, in denen keine Interaktion von Reggie-1 mit HIV-Gag nachgewiesen werden konnte. Reggie-2 hingegen ist mit Gag in einem hohen Ausmaß kolo­kalisiert. Die Kolo­kalisierung konnte sowohl bei den intrazellulären Vesikeln als auch an der Plasmamembran beobachtet werden, bei letzterer verstärkt an Zell-Zell-Kontaktstellen (Abbildung 3.8).

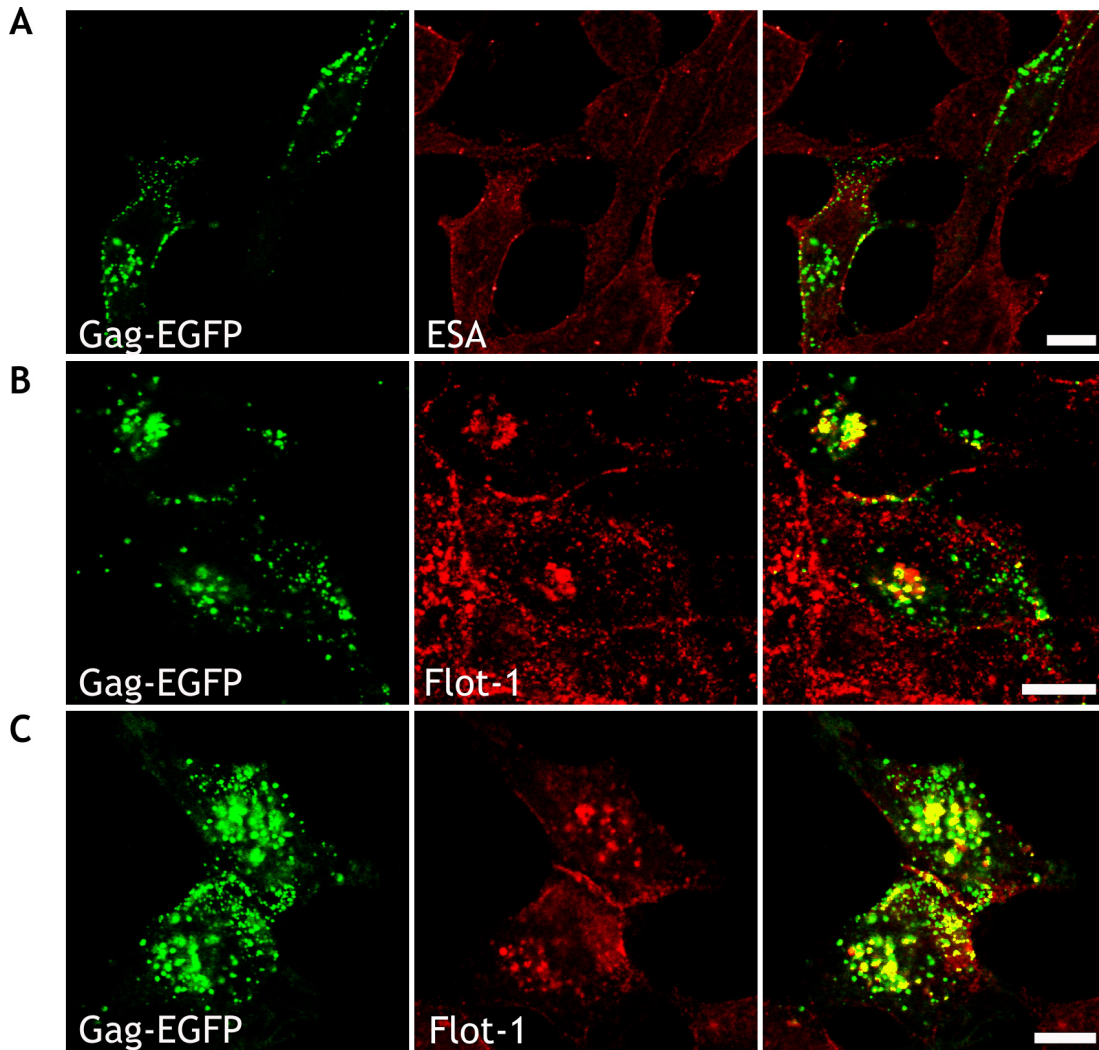


Abb. 3.8: Kolo­kalisierung von Gag-EGFP und Reggie-1 bzw. Reggie-2. HeLa Zellen wurden mit Gag-EGFP transfiziert. Die endogenen Reggie-Proteine (rot) wurden mit  $\alpha$ -ESA- (A, Reggie-1) bzw.  $\alpha$ -Flotillin1-Antikörpern (B und C, Reggie-2) nachgewiesen. In der rechten Spalte sind die überlagerten Immunfluoreszenzbilder dargestellt, Bereiche der Kolo­kalisierung erscheinen gelb. Die Abbildung zeigt, dass Reggie-2 mit Gag sowohl intrazellulär als auch an der Plasmamembran partiell kolo­kalisiert; eine Kolo­kalisierung von Reggie-1 mit Gag konnte in HeLa-Zellen nur in geringem Ausmass an der Plasmamembran beobachtet werden. Massbalken 10  $\mu$ m.

### 3.3.3 Überexpression von Reggie-2 führt zu einer Umverteilung von HIV-1 Gag

Die Überexpression von Proteinen ist ein Methode, die Rückschlüsse auf deren Funktion zulassen kann; die so gewonnenen Erkenntnisse müssen mit weiteren Methoden verifiziert werden, um aberrante Effekte ausschliessen zu können. Beispielsweise führt die Überexpression von Reggie-1 in HeLa Zellen zu einem „Aktin-Phänotyp“ mit deutlich ausgeprägten Filopodien [Neuman-Giesen *et al.* 2004].

In dieser Arbeit wurden zwei Reggie-2 Plasmide hergestellt, die über ein HA- bzw. myc-Epitop verfügen. Die Markierung mit einem Epitop hat den Vorteil, dass in biochemischen Experimenten zwischen endogenem und überexprimierten Protein unterschieden werden kann. Des Weiteren waren kommerziell erhältliche Antikörper gegen die verwendeten Epitope in vielen Anwendungsgebieten besser geeignet als der  $\alpha$ -Flotillin-1 Antikörper.

Das HA-markierte Reggie-2 war in HeLa-Zellen im Vergleich zum endogenen Protein hauptsächlich Plasmamembran-ständig lokalisiert. Die Expression der myc-markierten Variante führte ebenfalls zu einer ausgeprägte Färbung der Plasmamembran, des Weiteren lag das Protein in intrazellulären Vesikeln und zum Teil zytoplasmatisch gelöst vor. Durch beide Varianten wurde die Expressionsrate im Vergleich zum endogenen Protein ungefähr verdoppelt. Durch diese relativ leichte Überexpression ist ein artifizielles Verhalten des Proteins nur in geringem Ausmaß zu erwarten. Beiden Varianten ist dabei gemein, dass sie die Lokalisation von Gag-EGFP beeinflussen. Alleinige Expression von Gag-EGFP führte in HeLa Zellen zu einer Verteilung des Proteins innerhalb vesikulärer Strukturen und der Plasmamembran (Abbildung 3.8). Nach Koexpression von Gag-EGFP und Reggie-2-HA war fast der gesamte intrazelluläre Anteil des Gag-Proteins an der Plasmamembran lokalisiert, beide Proteine lagen dort überwiegend kolokalisiert vor (Abbildung 3.9).

Reggie-2-myc zeigte wie Reggie-2-HA verstärkte Lokalisation an der Plasmamembran, jedoch war hier im Gegensatz zu letzterem der intrazelluläre Anteil ebenfalls stärker ausgeprägt. Die für die Bindungsstudien generierte Deletionsmutante Reggie-2<sub>328-428</sub> zeigte in der Immunfluoreszenz eine

überwiegend lösliche Lokalisation und hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Lokalisation von Gag (vergleiche Abbildung 3.8). Durch die Überexpression von Reggie-2<sub>328-428</sub> verbleibt der Großteil des exprimierten Gag-EGFP in intrazellulären Vesikeln. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der Bindungsstudien, in denen das Reggie-2 Gesamtprotein, nicht aber Reggie-2<sub>328-428</sub> mit Gag interagierte.

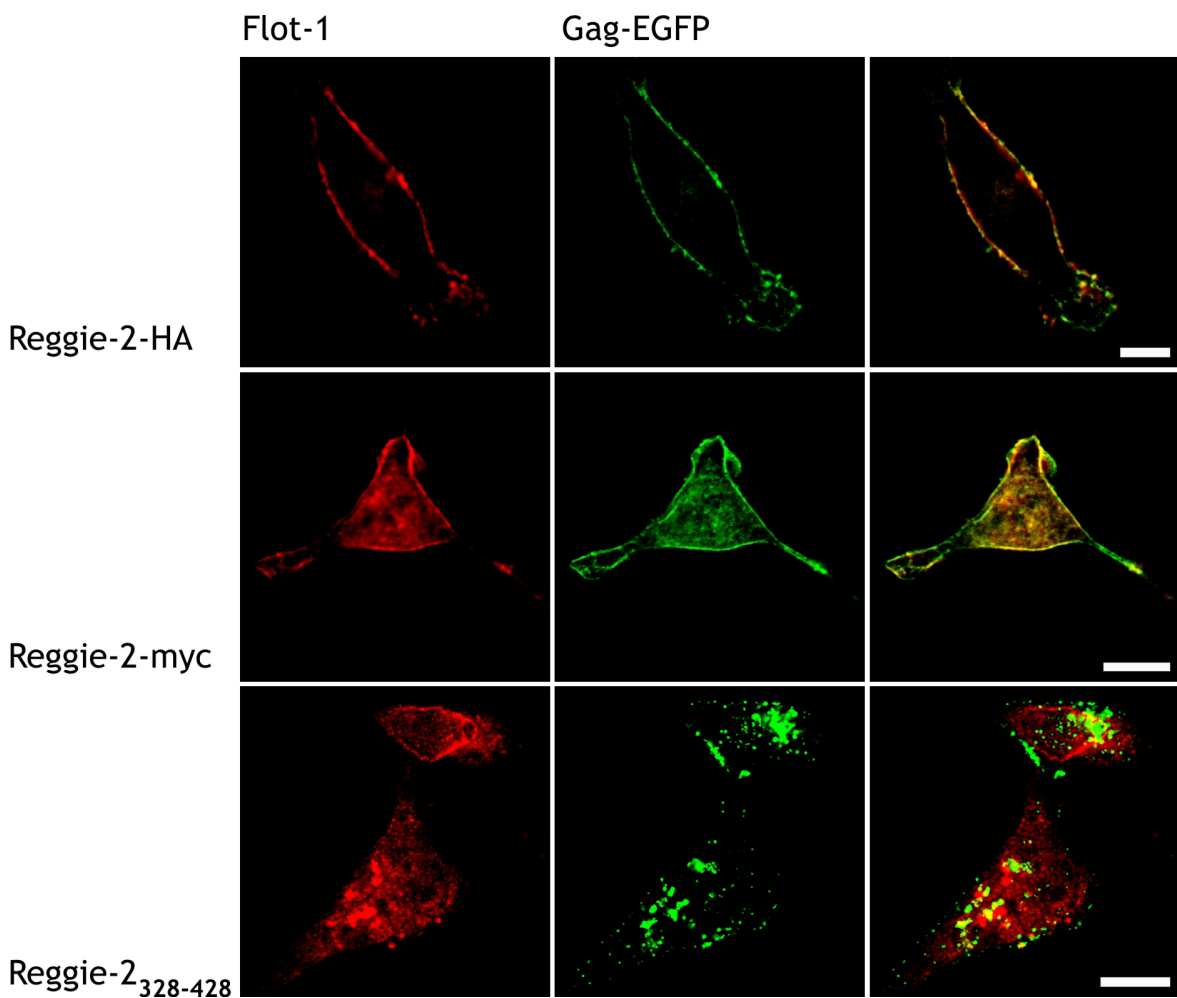


Abb. 3.9: Überexpression von Reggie-2 führt zu einer Umverteilung von HIV-1 Gag. Reggie-2-HA lokalisiert in HeLa-Zellen überwiegend an der Plasmamembran, an der es zu einem großen Anteil mit Gag kolokalisiert. Die myc-Epitop markierte Variante von Reggie-2 ist zu einem gewissen Anteil löslich, zeigt jedoch auch sowohl intrazellulär als auch an der Plasmamembran starke Kolokalisation mit dem viralen Protein. Die *coiled coil*-Deletionsmutante von Reggie-2 hingegen hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Gag. Massbalken 10 µm

Die Expression der beiden Epitop-markierten Reggie-2 Proteine führte zu einer deutlichen Umverteilung von HIV Gag. Die Fluoreszenz des EGFP-markierten viralen Proteins wechselte von einer punktuellen, mikrodomänen-ähnlichen Lokalisation zu einer Verteilung über annähernd die gesamte Plasmamembran. Ebenfalls in beiden Fällen war eine deutliche Kolo-kalisation von Gag mit Reggie-2 zu beobachten. Die Akkumulation von Gag-EGFP an der Plasmamembran Reggie-2 überexprimierender HeLa-Zellen deutet zusammen mit den Interaktions-Studien darauf hin, dass Reggie-2 einen direkten Effekt auf die Lokalisation von Gag hat.

### **3.3.4 Reggie-2 und Gag kolo-kalisieren mit Proteinen des ESCRT-Komplexes in HeLa-Zellen**

Das ESCRT-System (*endosomal complex required for transport*) ist ein Komplex aus mindestens achtzehn Proteinen, der für die Bildung von *multivesicular bodies* (MVBs) notwendig ist [Katzmann *et al.* 2002]. Das System wurde zunächst für Hefe-Zellen beschrieben und orthologe Proteine sind mittlerweile in Säugerzellen charakterisiert. MVBs entstehen, wenn kleine Vesikel in das Innere von Endosomen abgeschnürt werden [Gruenberg und Maxfield 1995]. Das ESCRT-I-Protein TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*) und dessen Hefe-Ortholog VPS-23 binden Cargo-Proteine, die in Endosomen transportiert werden. Das Protein Hrs rekrutiert dann diesen Komplex über Bindung an TSG101 an die endosomale Membran. Die Bindung von TSG101 an HRS erfolgt über dessen Aminosäure-Motiv PS/TAP und dieser Bindemechanismus wird von einigen RNA-Viren genutzt, um das ESCRT-System zu rekrutieren und so die Zelle über Exozytose der MVBs verlassen zu können.

Für HIV-Gag wurde beschrieben, dass es über ein PS/TAP-Motiv in p6 mit TSG101 interagiert [VerPlank *et al.* 2001]. Um zu überprüfen, ob es sich bei den in Abbildung 3.8 dargestellten Vesikeln, in denen Reggie-2 und Gag kolo-kalisieren, um solche endosomalen Kompartimente handeln könnte, wurden in HeLa Zellen das ESCRT-I-Protein TSG101 und das ESCRT-assoziierte Protein HRS überexprimiert und auf ihre Lokalisation bezüglich Reggie-2 untersucht. HRS

akkumulierte nach Überexpression in HeLa-Zellen in intrazellulären Vesikeln, die sehr dicht beieinander lagen und als sogenanntes „Hrs-Kompartiment“ bezeichnet werden (Abbildung 3.10 A und B). Innerhalb dieses Kompartiments konnte eine starke Kolokalisation mit endogenem Reggie-2 beobachtet werden, in geringerem Ausmaß auch an Teilen der Plasmamembran. Ebenfalls zeigt Gag-EGFP eine starke Kolokalisation mit Hrs in diesem Kompartiment.

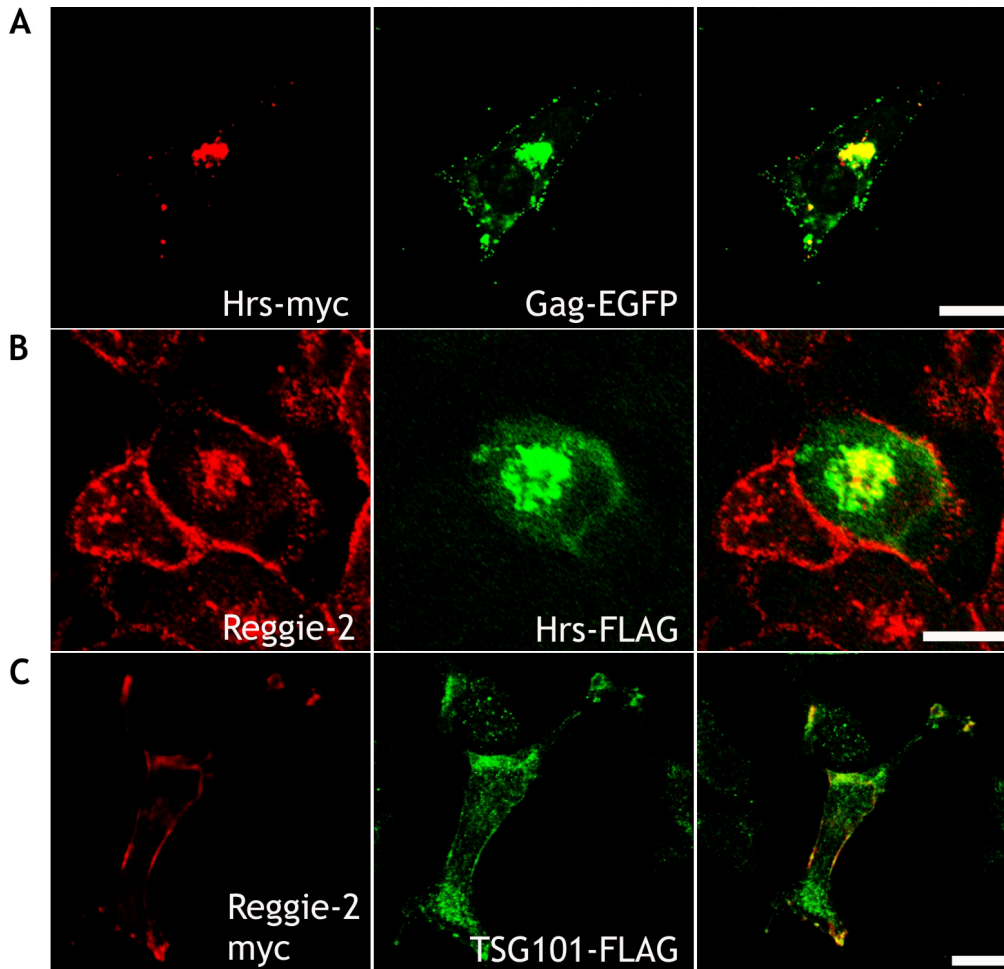


Abb. 3.10: Kolokalisation von Reggie-2 und Gag mit Proteinen des ESCRT-Komplexes.

A: HeLa-Zellen wurden mit dem ESCRT-assoziierten HRS-Protein transfiziert. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen ein myc-Epitop des Proteins (rot). Das überexprimierte Protein ist hauptsächlich in einer Anhäufung intrazellulärer vesikulärer Strukturen lokalisiert und zeigt dort starke Kolokalisation mit Gag-EGFP (grün). B: Überexpression von FLAG-markiertem HRS führt ebenfalls zur Ausbildung des „Hrs-Kompartiments“ (grün). Endogenes Reggie-2 (rot) zeigt hohe Kolokalisation mit HRS innerhalb dieser Struktur. C: HeLa-Zellen, die das mit Flag-Markierung versehene Protein Tsg101 (grün) überexprimierten, wurden mit Antikörpern gegen die Epitop-Markierung gefärbt. Reggie-2 wurde mit  $\alpha$ -Flotillin-Antikörper dargestellt. Das ESCRT-1-Protein TSG101 ist hauptsächlich intrazellulär in Vesikeln und an Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisiert. Massbalken 10  $\mu$ m.



Die Immunfluoreszenz-Studien lassen dabei den Schluss zu, dass Gag in HRS-überexprimierenden Zellen aggregiert und in dem Hrs-Kompartiment zurückgehalten wird. Wie bereits gezeigt, führt die Überexpression von Reggie-2 zu einer Umverteilung von Gag (Abbildung 3.9). In HeLa-Zellen, die Reggie-2-myc, Gag und TSG101 überexprimierten, war eine starke Kolokalisation der drei Proteine an der Plasmamembran zu beobachten (Abbildung 3.11). Ebenfalls war in den intrazellulären Bereichen, in denen Reggie-2-myc akkumuliert, eine Kolokalisation mit TSG101 zu sehen.

Eine Interaktion von TSG101 mit Gag wurde beschrieben [Garrus *et al.* 2001, VerPlank *et al.* 2001]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Kolokalisationsstudien deuten darauf hin, dass Reggie-2 bei dieser Interaktion eine Rolle spielen könnte.

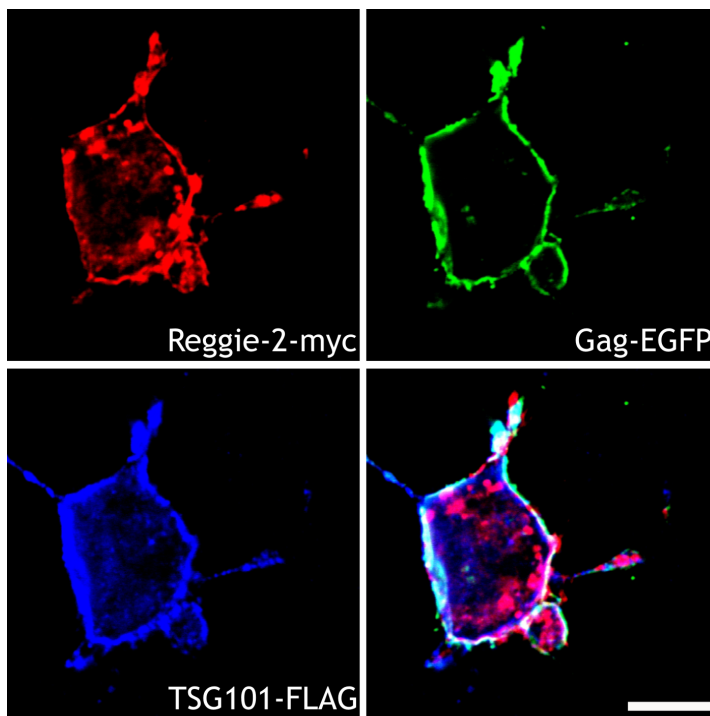


Abb 3.11 Lokalisation von überexprimiertem Reggie-2, Gag und TSG101.

In HeLa-Zellen, die myc-Epitop-markiertes Reggie-2 exprimieren ist Gag-EGFP fast ausschliesslich an der Plasma-membran lokalisiert. Die Überexpression von TSG101 hat keinen sichtbaren Einfluss auf die Verteilung von Gag oder Reggie-2, alle drei Proteine sind zu einem großen Anteil an der Plasmamembran kolokalisiert. Reggie-2 (rot) wurde mit  $\alpha$ -myc-Antikörper, TSG101 (blau) mit einem Antikörper gegen das Flag-Epitop markiert. Massbalken 10  $\mu$ m.

### 3.4 Interaktion von Reggie-2 und HIV-1 Gag *in vivo*

#### 3.4.1 Gag koimmunpräzipitiert endogenes Reggie-2 in HeLa Zellen

Die bis dato verwendeten Methoden zeigten eine Interaktion von Gag mit Reggie-2 *in vitro* und Kolo-kalisation in Immunfluoreszenz-Studien. Mittels Koimmunpräzipitation sollte gezeigt werden, ob eine Interaktion zwischen Reggie-2 und Gag in Säugerzellen stattfindet.

Hierzu wurden HeLa Zellen verwendet, die Gag transient exprimierten; die Lyse der Zellen erfolgte drei Tage nach Transfektion. Die Präzipitation von Gag erfolgte mit einem Antikörper gegen das Capsid Protein p24, der sowohl p24 als auch das Vorläuferprotein p55 erkennt. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Die Präzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und Protein mittels Antikörpermarkierung nachgewiesen. In Abbildung 3.12 ist gezeigt, dass Reggie-2 mit Gag koimmunpräzipitierte. Die Lysate der untransfizierten Kontrollzellen zeigten kein spezifisches Gag-Signal und der  $\alpha$ -Capsid-Antikörper ist nicht in der Lage, Reggie-2 zu präzipitieren.

#### IP: $\alpha$ -Capsid

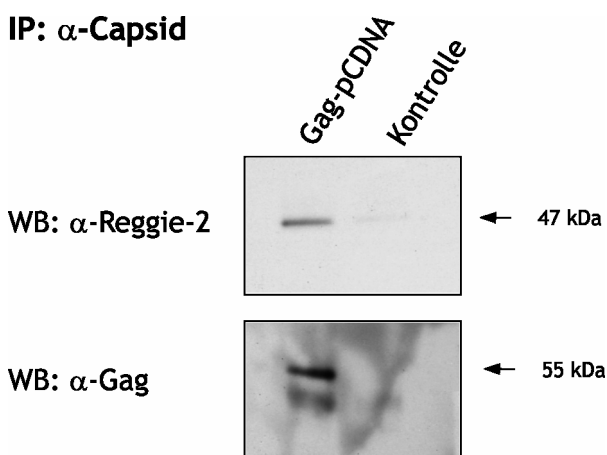


Abb. 3.12: Endogenes Reggie-2 koimmunpräzipitiert mit Gag. Gag-exprimierende HeLa Zellen wurden lysiert und endogenes Reggie-2 mit einem HIV spezifischen Antikörper koimmunpräzipitiert.

### 3.4.2 Reggie-Proteine sind in virusähnlichen Partikeln vorhanden

Wenige Jahre nach Entdeckung des Humanen Immundefizienz Virus konnte gezeigt werden, dass das Gag-Protein alleine ausreicht, um virusähnliche Partikel (VLP) zu generieren, die von der Zellmembran abschnüren [Gheysen *et al.* 1989]. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen weisen diese VLP ähnliche Größe wie natives Virus auf. Durch das Fehlen der viralen Protease und deren proteolytischen Spaltung des Gag-Vorläuferproteins nach dem Abschnüren von der Zellmembran sind diese Partikel jedoch von infektiösen Partikeln zu unterscheiden. Diese Eigenschaft von Gag unterstreicht dessen zentrale Bedeutung für die Assemblierung von HIV.

Zunächst sollte untersucht werden, ob HeLa Zellen virusähnliche Partikel generieren und ob letztere Reggie-Proteine enthalten. Dazu wurden die Zellen transient mit Gag-EGFP und in einer Doppeltransfektion zusätzlich mit Reggie-2-myc transfiziert. Als Kontrolle dienten HeLa Zellen, die transient mit GPI-GFP transfiziert waren. Drei Tage nach Transfektion wurde das Zellkultur-Medium zunächst in zwei Schritten zellfrei pelletiert. Der resultierende Überstand wurde einem weiteren Ultrazentrifugationsschritt zugeführt, um entstandene Partikel zu pelletieren. Abbildung 3.13 zeigt, dass Gag-transfizierte HeLa-Zellen VLPs generieren und sich diese mit der durchgeführten Methode isolieren und konzentrieren lassen.

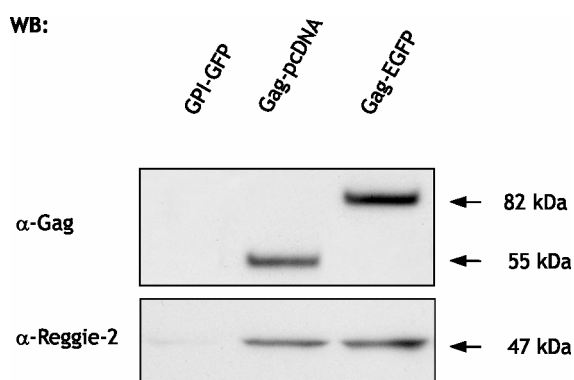


Abb. 3.13: Gag exprimierende HeLa Zellen generieren Virusähnliche Partikel. Die Pellets von Zellkulturüberständen transient transfizierter Zellen wurden nach drei Zentrifugationsschritten lysiert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgte mit entsprechenden Antikörpern nach Immunoblotting.

### 3.4.3 Herabregulierung der Reggie-Proteine mittels siRNA führt zu erhöhter Partikelfreisetzung in HeLa Zellen

Durch die Ergebnisse der bis dato durchgeführten Experimente stellte sich die Frage nach einer funktionellen Bedeutung der Interaktion zwischen Reggie-2 und Gag. Eine Methode zur Überprüfung der Funktion einer Protein-Protein-Interaktion besteht in der Verwendung von siRNA (*short interfering RNA*) zur gezielten Herabregulierung eines Interaktionspartners. Die Verminderung der Expression endogener Proteine (*knockdown*) durch Interferenz ist ein mittlerweile etabliertes Verfahren, um Aufschluss über die Funktion von Proteinen zu gewinnen [Elbashir *et al.* 2001 a und b]. In dieser Arbeit wurden die Reggie-Proteine in HeLa-Zellen mittels Vektor-basierter „*small hairpin RNA*“ herabreguliert [McManus *et al.* 2002]. Das verwendete Vektor-System pTER<sup>+</sup> wurde freundlicherweise von Dr. van de Wetering zur Verfügung gestellt [van de Wetering *et al.* 2003]. Die Konstrukte zur Verminderung der Expression von Reggie-1 (R1B) und Reggie-2 (R2A) wurden in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, führen sowohl die Herabregulierung von Reggie-1 als auch die von Reggie-2 zu einer Verminderung von Reggie-2. Die Verminderung von Reggie-2 durch Herunterregulation von Reggie-1 geschieht dabei auf Proteinebene, mittels RT-PCR konnte kein signifikanter Unterschied des Reggie-2 RNA-Gehaltes zwischen R1B- und Kontroll-Zellen detektiert werden [Richter und Tikkanen, nicht veröffentlicht]. Dies könnte mit einer verkürzten Halbwertszeit von Reggie-2 nach Reggie-1-Verminderung zusammen hängen und deutet darauf hin, dass die Heterodimerisierung der Reggie-Proteine eine physiologische Funktion hat.

Die Stärke der Expression von Reggie-2 wurde in den Lysaten der Zellen mittels Antikörperfärbung nach Immunoblotting bestimmt und ist bei beiden siRNA-Proben im Vergleich zur Kontrolle deutlich vermindert. Im Gegensatz dazu ist die Anzahl der VLPs deutlich erhöht, was aus der stärkeren Bande für Gag in der R2A-Probe hervorgeht.

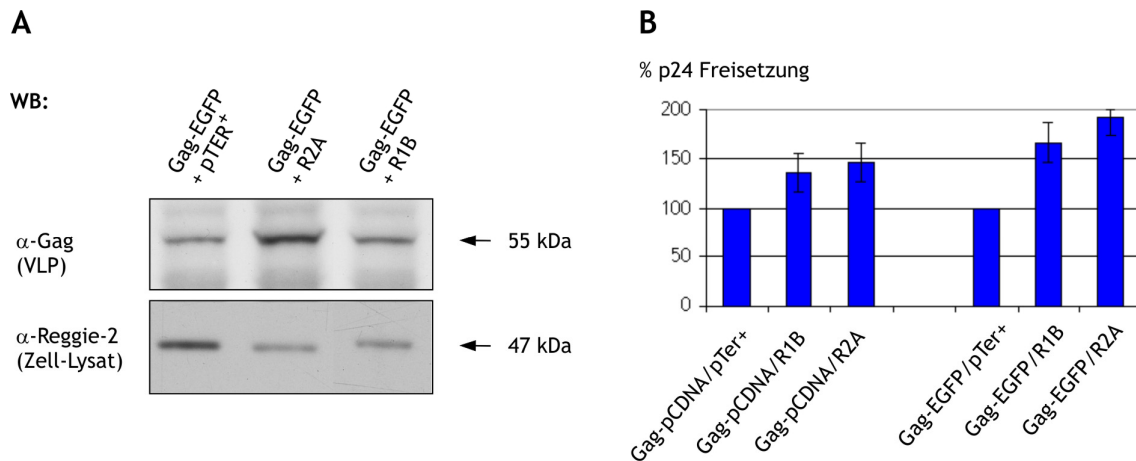


Abb. 3.14: siRNA *knockdown* der Reggie-Proteine in HeLa Zellen führt nach transienter Gag Transfektion zu vermehrter Partikelfreisetzung.

**A:** HeLa Zellen wurden transient mit Gag-EGFP und einem siRNA-Konstrukt zur Herabregulierung von Reggie-1 (R1B), Reggie-2 (R2A) oder dem Leervektor (pTER<sup>+</sup>) transfiziert. **B:** Die Produktion von VLP wurde mittels p24-ELISA bestimmt. Die Menge an freigesetztem p24 war deutlich erhöht, wenn Reggie-Proteine mittels siRNA herabreguliert waren.

Das bemerkenswerte Ergebnis dieser Experimente war, dass die Herabregulierung der Reggie-Proteine zu einer deutlich erhöhten Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel in das Medium führt. Die Zellkultur-Überstände und die Lysate der für die siRNA-Versuche transfizierten HeLa-Zellen wurden mit einem kommerziellen HIV p24-ELISA untersucht. Da die Anzahl der p24- bzw. Gag-Moleküle im Virus und in VLPs relativ konstant ist, können durch diesen Test Rückschlüsse auf die Anzahl der gebildeten Partikel geschlossen werden. Der Graph in Abbildung 3.14B zeigt die veränderte Partikelfreisetzung der siRNA-Proben im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen in Prozent. Je nach verwendetem Gag-Konstrukt wurden von den R2A-HeLas bis zu 80% mehr VLPs freigesetzt als von Zellen, die mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurden. Interessanterweise zeigte sich in Immunfluoreszenz-Studien der für die siRNA-Experimente verwendeten HeLa-Zellen eine eher löslich erscheinende Lokalisation von Gag (Abbildung 3.15). Dies deutet darauf hin, dass das Protein in Reggie-2 defizienten Zellen weniger in der Lage war, zu Rafts der Plasmamembran oder intrazellulärer Membranen transportiert zu werden.

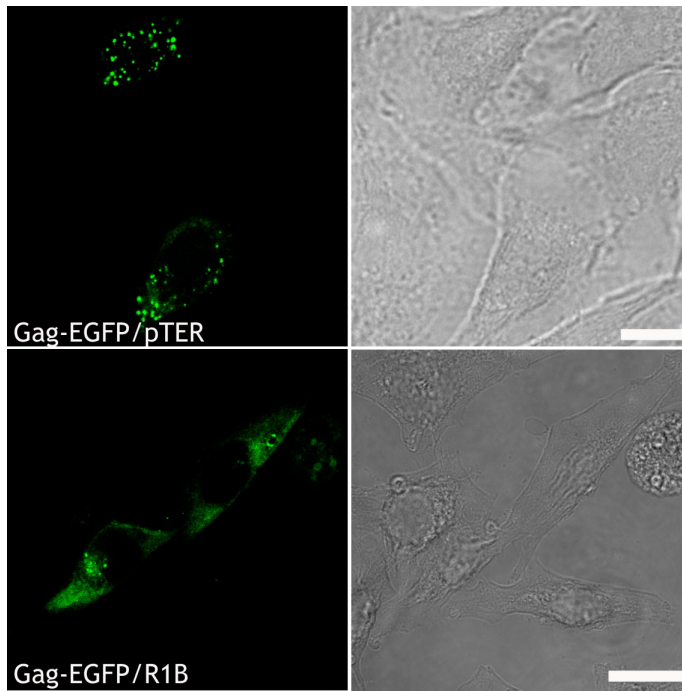


Abb. 3.15 : Herabregulierung von Reggie-2 beeinflusst die Verteilung von Gag in HeLa-Zellen  
In den Kontrollzellen zeigte Gag-EGFP die bereits beschriebene Verteilung. Die Herabregulierung der Reggie-Proteine führte zu einem ungleichmäßigeren, teilweise löslich erscheinenden Verteilungsmuster von Gag. Massbalken 10  $\mu$ m.

### 3.5 Interaktion von Reggie-2 und HIV-1 Gag in Virus-infizierten primären Lymphozyten

#### 3.5.1 Native HIV-Partikel enthalten Reggie-1 und Reggie-2

Da im Verlauf der Arbeit festgestellt wurde, dass eine Interaktion von Reggie-2 mit HIV-Gag stattfindet und sich das Ausmaß der Expression auf die Produktion Virus-ähnlicher Partikel auswirkt, sollte nun untersucht werden inwieweit die Reggie-Proteine in Virus infizierten T-Lymphozyten eine Rolle spielen.

Das Gag-Protein p55 wird in infizierten Zellen als Vorläuferprotein exprimiert, durch die virale Protease wird es in die funktionellen Untereinheiten Matrix (MA, p17), Kapsid (CA, p24), Nukleokapsid (NC, p7) und p6 gespalten. Diese proteolytische Spaltung findet in einem als Reifung bezeichneten Prozess während und nach dem Abschnüren der Partikel statt. Daher kann man zum einen in Zelllysaten infizierter Lymphozyten einen geringen Anteil von p24 nachweisen, zum anderen enthalten Lysate von HIV-Partikeln noch einen geringen Anteil des Gesamtproteins (Abbildung 3.16 A).

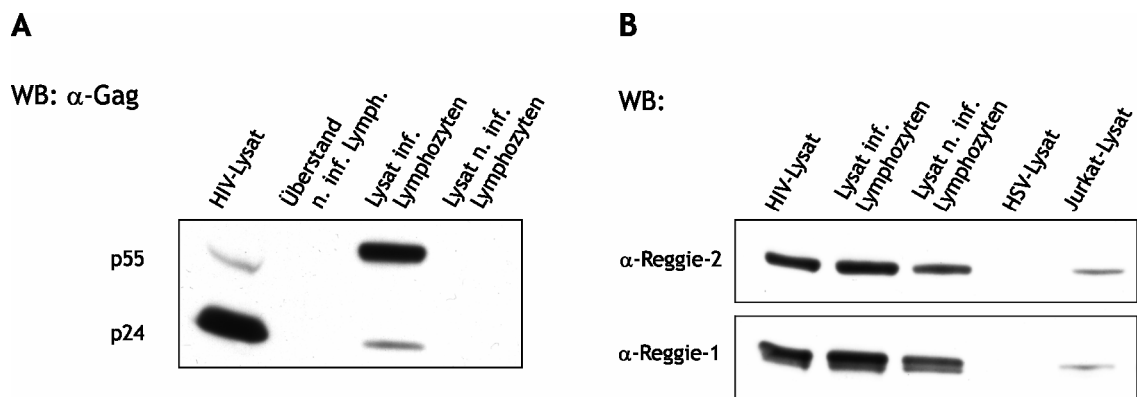


Abb. 3.16: Reggie-Proteine sind in die Hülle von HIV-1 integriert.

**A:** In reifen HIV-Partikeln liegt das Gag-Protein nach Protease-Spaltung in den Untereinheiten p17, p24, p7 und p6 vor; unreife Partikel enthalten hauptsächlich das Vorläuferprotein p55. Der verwendete Antikörper erkennt ein p24-Epitop und markiert auch das Gesamtprotein. **B:** Zellkultur-Überstände HIV-infizierter primärer Lymphozyten wurden benutzt, um Viruspartikel zu isolieren. Nach Lyse der Partikel konnte mittels Immunoblotting gezeigt werden, dass sowohl Reggie-1 als auch Reggie-2 in das Virus aufgenommen werden. Als Kontrolle diente ein Lysat des Humanen Herpesvirus (HSV), welches ebenfalls Membran umhüllt ist, jedoch keines der Reggie-Proteine in die Hülle integriert. Die Lysate sowohl infizierter als auch nicht infizierter Lymphozyten zeigen im Vergleich zu einer T-Zelllinie (Jurkat) eine hohe Expressionsrate beider Reggie-Proteine. (inf. : HIV infiziert; n. inf. : nicht infiziert)

In Abbildung 3.16 B ist gezeigt, dass beide Reggie-Proteine in die Plasmamembran-Hülle nativer HIV-Partikel integriert sind. Eine Doppelbande im Fall von Reggie-1 deutet auf eine putative Calpain-Spaltung dieses Proteins hin, die auch in Lysaten von Zelllinien beobachtet wurde [Mairhofer *et al.* 2002]. Jurkat T-Zellen enthalten ebenfalls beide Reggie-Proteine, allerdings scheinen diese in der Zelllinie weniger stark exprimiert zu werden als in primären T-Zellen.

Das Humane Herpesvirus-1 wird in infizierten Zellen zunächst im Kern assembliert und nach Abschnürung durch die Kernmembran in das Endoplasmatische Reticulum entlassen, wo es die Hülle aus Kernmembran wieder verliert. Die Freisetzung der Viren erfolgt durch Lyse der Zellen. Aus welchem Zellkompartiment die dann wiedererlangte Virushülle stammt, ist noch nicht abschliessend geklärt. Reggie-Proteine konnten in diesen Partikeln nicht nachgewiesen werden. Ein Immunoblot der HSV-Lysate mit einem Antikörper gegen das virale Protein Gc zeigte, dass die Lysate eine hohe Konzentration von HSV-Partikeln aufwies (Daten nicht gezeigt).

### 3.5.2 Reggie-2 kolokalisiert mit HIV-Gag in primären infizierten Lymphozyten

Die Immunfluoreszenz-Studien in HeLa-Zellen zeigten, dass Reggie-2 mit überexprimiertem Gag-EGFP in einem hohen Ausmaß kolokalisiert. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die Interaktion von Reggie-2 mit Gag auch *in vivo* relevant ist, wurden primäre T-Lymphozyten mit HIV infiziert und anschliessend immunfluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Abbildung 3.17 zeigt, dass endogenes Reggie-2 in einer „cap“-artigen Struktur aktivierter T-Zellen angereichert ist und dort in einem hohen Ausmaß mit Gag kolokalisiert, welches ebenfalls verstärkt in diesem Bereich der Plasmamembran lokalisiert

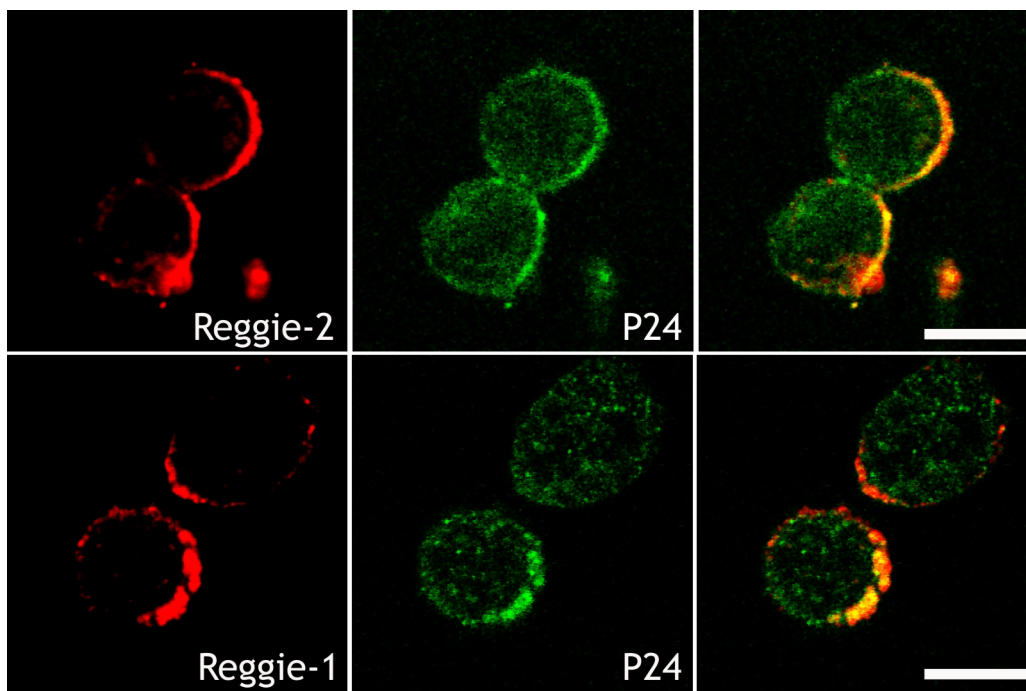


Abb. 3.17: Reggie-Proteine kolokalisieren mit HIV-1 Gag in primären infizierten Lymphozyten. Primäre Lymphozyten wurden mit einem HIV-1 Laborstamm infiziert und nach vier Tagen mit Antikörpern gegen die p24 und Reggie-1 bzw. Reggie-2 gefärbt. Beide Reggie-Proteine (jeweils rot) sind in T-Zellen in einer *cap*-artigen Struktur stark angereichert und kolokalisieren dort mit HIV-1 Gag (grün).

Obwohl keine direkte Interaktion von Reggie-1 mit Gag nachgewiesen werden konnte, zeigte es ebenfalls starke Kolokalisation mit Gag. Da jedoch Reggie-1 und Reggie-2 Heterodimere bilden können und an der Plasmamembran von Lymphozyten stark kolokalisieren, könnte es sich um einen dicht gepackten



Komplex aus den beiden Reggie-Proteinen und dem viralen Protein handeln, in dem Reggie-1 mit Reggie-2 und letzteres mit HIV-Gag interagiert.

Wie schon für die Überexpression-Studien in HeLa-Zellen beschrieben, konnte eine Kolokalisation von Reggie-2 mit dem ESCRT-1-Protein TSG101 gezeigt werden. In HIV-infizierten T-Zellen konnte dies für die endogenen Proteine bestätigt werden. TSG101 kolokalisiert mit endogenem Reggie-1 und Reggie-2, was wiederum auf die Interaktion der beiden Reggie-Proteine zurückgeführt werden kann, desweiteren wurde zwischen TSG101 und Gag eine starke Kolokalisation beobachtet (Abbildung 3.18).

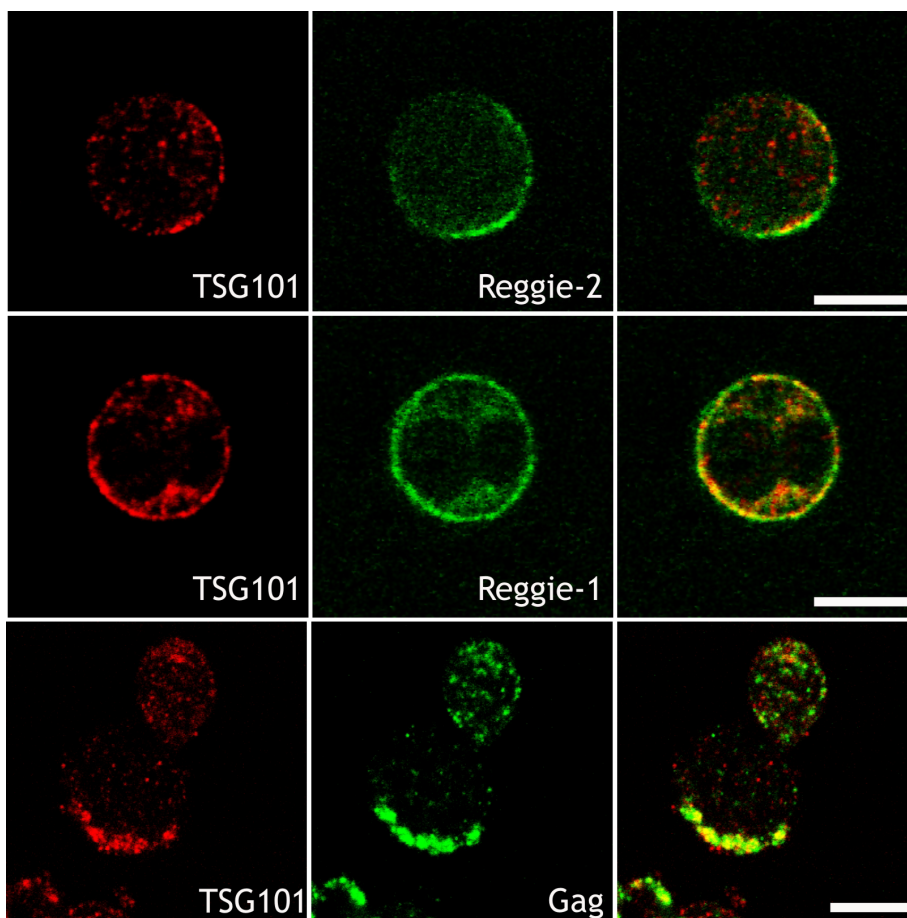


Abb. 3.18: Kolokalisation von TSG101 mit endogenen Reggie-Proteinen bzw. HIV-Gag in infizierten primären Lymphozyten. In der rechten Spalte ist die Überlagerung der Immunfärbungen dargestellt. TSG101 (jeweils rot) kolokalisiert mit den Reggie-Proteinen und Gag hauptsächlich an der Plasmamembran. Massbalken 10  $\mu$ m.

## 4 Diskussion

### 4.1 Strukturelle Aspekte der Reggie-Proteine

Die Reggie-Proteine Reggie-1 und -2 sind multifunktionale Proteine, deren Rolle bei Signaltransduktions-Vorgängen, der Zytoskelett-Modulierung und der Sekretion diskutiert werden [Baumann *et al.* 2000, Rajendran *et al.* 2003, Stürmer *et al.* 2004, Neumann-Giesen *et al.* 2004]. Sie gehören zu einer Gruppe von Proteinen mit einer sogenannten SPFH-Domäne, deren Funktion bisher noch nicht verstanden ist [Tavernarakis *et al.* 1999]. Beide Reggies sind über Lipidmodifikationen an der Innenseite der Plasmamembran und an intrazellulären Vesikeln in Lipid Rafts verankert [Morrow *et al.* 2002, Neumann-Giesen *et al.* 2004]. Für Reggie-2, das im Vergleich zu dem myristylierten und mehrfach palmitylierten Reggie-1 nur eine Palmitylierungsstelle aufweist, wurden innerhalb der SPFH-Domäne zwei hydrophobe Bereiche beschrieben, von denen einer für die Membranlokalisation, der andere für die Lokalisation in Lipid Rafts notwendig zu sein scheint [Liu *et al.* 2005]. Die Reggies sind über eine Vielzahl von Spezies hinweg hochkonserviert, was auf eine wichtige Funktion schliessen lässt, sie besitzen jedoch neben der SPFH-Domäne keine beschriebenen Domäne, die über funktionelle Aspekte der Proteine Aufschluss geben könnte.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Reggie-Proteine Homo- und Heterooligomere bilden können. Dieses Ergebnis wird von der partiellen Kolo-kalisation in Zelllinien unterstützt [Stürmer *et al.* 2001]. Ausserdem deutet die verminderte Reggie-2-Expression in solchen Zellen, in denen Reggie-1 mittels siRNA herabreguliert wurde, auf eine Interaktion dieser beiden Proteine hin [Richter und Tikkanen, nicht veröffentlicht]. Die Oligomerisierung von Raft-Proteinen stabilisiert die Assoziation von acylierten Proteinen mit DRMs [Field *et al.* 1995]. Da Reggie-2 im Gegensatz zu Reggie-1 nur einfach palmityliert ist, wird die Raft-Affinität von Reggie-2 durch die Oligomerisierung wahrscheinlich weiter erhöht. Für Reggie-1 ist die Oligomerisierung eine notwendige Voraussetzung für die Raft-Assoziation [Neumann-Giesen *et al.* 2004]. Das Fehlen von Reggie-1 hingegen könnte sich auf die Halbwertszeit von Reggie-2 auswirken. Es ist denkbar,

dass durch die Oligomerisierung die Degradation von Reggie-2 verzögert wird. Interessanterweise wurde der Effekt nur in eine Richtung beobachtet. Eine Herabregulierung von Reggie-2 wirkt sich nicht signifikant auf die Expression oder die Halbwertszeit von Reggie-1 aus.

Unabhängig von der noch nicht endgültig geklärten Domänenstruktur der Reggie-Proteine scheint es so zu sein, dass die Interaktion von Reggies mit Proteinen über den C-Terminus vermittelt wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dies sowohl für die Homo-Oligomerisierung als auch die Interaktion mit weiteren Bindepartnern gilt. Dahingegen scheint der N-Terminus für die Membran-Assoziation der beiden Reggies verantwortlich zu sein. In Reggie-1 ist dies durch N-terminale Lipidmodifikationen gewährleistet, ein funktioneller Aspekt dieser Assoziation wurde bereits beschrieben [Neumann-Giesen *et al.* 2004].

## 4.2 Reggie-2 – Ein neuer Interaktionspartner von HIV Gag

### 4.2.1 Interaktion von Reggie-2 mit Gag

Das gag-Gen von HIV-1 und verwandten Retroviren kodiert für ein Vorläuferprotein, das durch die virale Protease nach Reifung der Partikel in vier funktionelle Proteine gespalten wird. Diese resultierenden Proteine sind durch Ausbildung des Kapsids und des Nukleokapsids von HIV für die Struktur der Partikel verantwortlich. Das unprozessierte Gag-Protein allein ist in der Lage, nach Expression in Zellen virusähnliche Partikel zu bilden, die von der Zellmembran abschnüren [Gheysen *et al.* 1989]. Daher ist die Aufklärung molekularer Zusammenhänge der Assemblierung essentiell für das Verständnis der Pathogenese der HIV-bedingten Erkrankung AIDS.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein Raft-Protein direkt mit dem HIV-Strukturprotein Gag interagiert. Die Bindung von Reggie-2 an Gag wurde zunächst über ein Yeast two-hybrid System bestimmt und durch Koimmunpräzipitation, *in vitro*-Bindung und Kollokalisationsstudien experimentell verifiziert. Mittlerweile konnte durch einen Kooperationspartner unserer Arbeitsgruppe mittels FRET-Experimenten (*fluorescence resonance energy transfer*) die Interaktion von Reggie-2 und Gag durch ein weitere Methode

bestätigt werden [Ruonala, nicht veröffentlicht]. Die Gag-Bindedomäne von Reggie-2 liegt im C-terminalen Bereich des Proteins und somit ausserhalb der SPFH-Domäne, die ungefähr die ersten zweihundert N-terminalen Aminosäuren von Reggie-2 umfasst. Hinweise, dass eine funktionelle Domäne von Reggie-2 in dessen C-Terminus liegt, ergeben sich auch aus der Tatsache, dass sowohl Homo- als auch Heterooligomerisierung über diesen Teil des Proteins vermittelt wird.

Obwohl die genaue Funktion von Reggie-2 noch nicht bekannt ist, gibt es Daten, die das Protein mit unterschiedlichen zellulären Prozessen in Verbindung bringen. Diesen Prozessen ist dabei gemein, dass sie mit Lipid Rafts in einem molekularen Zusammenhang stehen. Im Fall des alternativen Insulin-Signalwegs, in dem Reggie-2 einen Komplex aus CAP und cbl in Rafts rekrutiert, scheint Reggie-2 eine Transportfunktion wahrzunehmen [Baumann *et al.* 2000]. Eine Interaktion von Reggie-2 mit dem Adaptor-Protein ArgBP2 deutet ebenfalls auf eine solche Funktion hin. ArgBP2 bindet Reggie-2 mit seiner SoHo-Domäne, eine weitere Bindung an die Tyrosinkinase Pyk2 und cbl erfolgt mit den SH3-Domänen des Proteins. Dieser Komplex, der durch Reggie-2 in Lipid Rafts lokalisiert wird, spielt eine Rolle bei NGF-induzierter Stimulation von Zellen. Allerdings scheint die Raft-Lokalisation noch von weiteren Faktoren abzuhängen, da SoHo-Deletionsmutanten von ArgBP2 noch teilweise in Rafts lokalisieren [Haglund *et al.* 2004]. Auch während der Axonregeneration im Goldfisch-Sehnerv könnte die Funktion von Reggie-2 darin liegen, Proteine in Rafts zu transportieren, da gerade bei Wachstumsprozessen und Differenzierung der zielgerichtete Transport von Proteinen eine wichtige Rolle spielt.

Die Art und Weise, wie sich ein Virus die Interaktion mit einem Wirtsprotein zu Nutze macht, bietet ebenfalls Einblicke in molekulare Zusammenhänge zellulärer Komponenten. Gag hat eine zentrale Bedeutung für HIV, und der akkurate Transport und die Assemblierung von Gag sind essentiell für den Replikationszyklus des Virus. Da die Bindung von Reggie-2 an das Gag-Gesamtprotein und den p24-Anteil stärker war als an die anderen Spaltprodukte, ist es möglich, dass es sich auch hier um einen Transportprozess handelt. Die Membranlokalisation von Gag wird hauptsächlich durch den N-terminalen p17-Anteil des Proteins vermittelt. Die p17-Domäne allein reicht dafür allerdings nicht aus, p17-EGFP liegt nach Transfektion von 293T-Zellen fast ausschließlich

löslich vor [Ding et al. 2003]. In einer weiteren Studie mit Gag-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass zusätzlich ein N-terminaler Anteil von p24 notwendig ist, damit das Protein an der Plasmamembran lokalisiert [Ono und Freed, 2001]. Die Interaktion von Reggie-2 könnte die Raft-Assoziation des viralen Proteins weiter erhöhen. Außerdem ist es eher unwahrscheinlich, dass Reggie-Proteine eine Funktion im gereiften Partikel erfüllen, da sie keine katalytische Aktivität besitzen und Rafts für die Neuinfektion von Wirtszellen nicht essentiell sind [Popik et al. 2002, Percherancier et al. 2003, Popik et al. 2004].

### 4.2.2 HIV und Lipid Rafts

Da HIV ein Membran-umhülltes Virus ist, spiegelt die Zusammensetzung der Virushülle den Ort des *buddings* wieder. Studien, die sich mit der Zusammensetzung der Virushülle beschäftigten, konnten zeigen, dass die Komposition der Virushülle nicht der durchschnittlichen Verteilung von Proteinen und Lipiden der Plasmamembran entspricht [Aloia et al. 1993]. So ist zum Beispiel das Verhältnis von Cholesterol zu Phospholipiden in der Virushülle 2,5 mal grösser als das in der Plasmamembran von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

Die Faktoren, die eine Assemblierung von Viren an Zellmembranen ermöglichen, sind noch nicht im Detail verstanden. Frühe Untersuchungen bezogen sich hauptsächlich auf CD4<sup>+</sup>-Leukozyten, die das primäre Ziel der HIV-Infektion darstellen. In diesen Zellen schnürt das Virus von der Plasmamembran ab [Lecatsas et al. 1984, Palmer et al. 1988, Rappersberger et al. 1988]. Mittlerweile ist anerkannt, dass die Assemblierung und das Abschnüren viraler Partikel von T-Zellen in Lipid Rafts stattfindet. Immunfluoreszenz-Studien, die eine Kolo-kalisation von HIV-Gag mit den GPI-verankerten Proteinen Thy1 und CD59 und dem Gangliosid GM1 zeigten, gaben erste Hinweise auf die Raft-Assoziation. Ausserdem findet man die HIV-Proteine gp41 und Gag-p17 in DRMs angereichert [Nguyen und Hildreth 2000]. Diese Ergebnisse wurden von anderen Gruppen verifiziert und finden eine Bestätigung in der Tatsache, dass die Membran umhüllter Retroviren von der durchschnittlichen Zusammensetzung der

Plasmamembran abweicht und mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert ist [Renkonen *et al.* 1971, Pessin *et al.* 1980, Aloia *et al.* 1993].

Im Fall von Reggie-1 sorgen Lipidmodifikationen des Proteins für dessen Raft-Lokalisation. HIV Gag ist ebenfalls myristyliert, allerdings wurde für diese Modifikation eine andere Funktion beschrieben. Durch die Induktion einer Konformationsänderung in der Matrix-Domäne von Gag scheint die Myristylierung eine Rolle in der Multimerisierung zu spielen [Bouamr *et al.* 2003]. Studien in Cos-1 Zellen, die mit verschiedenen ungesättigten Fettsäuren behandelt wurden, zeigten, dass die Gag-Myristylierung notwendig für die Partikel-Abschnürung ist [Lindwasser und Resh, 2002]. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass mit diesem Verfahren auch die Myristylierung vieler zellulärer Proteine unterbunden wird. Ausserdem ist die Myristylierung nicht allein verantwortlich für die DRM-Assoziation von Gag. Eine GFP-markierte Matrix-Domäne (p17) lokalisiert trotz der Lipidmodifikation kaum in Rafts [Ding *et al.* 2003]. Zusätzlich ist die sogenannte I-Domäne im NC-Anteil (p7) des Gag-Proteins für die Raft-Lokalisation notwendig. Diese I-Domäne vermittelt die Oligomerisierung von Gag [Sandefur *et al.* 1998]. Es ist also wahrscheinlich, dass noch weitere Faktoren bei der Raft-Lokalisation eine Rolle spielen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verminderung der Reggie-Expression zu einer eher löslichen Lokalisation von Gag-EGFP in HeLa-Zellen führt. In Bezug auf HIV könnte das Raft-Protein Reggie-2 demnach ein zellulärer Faktor sein, der die Raft-Lokalisation von Gag unterstützt.

Die Depletion von Cholesterol und die damit verbundene Zerstörung von Lipid Rafts mit Methyl-beta-Cyclodextrin (M $\beta$ CD) oder Statinen ist ein verbreitetes Verfahren, um die Effekte der Raft-Assoziation von Proteinen zu untersuchen. Im Fall von HIV wirkt sich eine solche Depletion sowohl auf die Fusion und das Abschnüren, als auch auf die Infektiosität von Partikeln aus [Nguyen *et al.* 2000, Liao *et al.* 2001, Ono und Freed 2001, Graham *et al.* 2003]. Rafts sind also essentiell für den Replikationszyklus von HIV. Dabei sind verschiedene Modelle denkbar, die die Rolle von Rafts in der Assemblierung von HIV erklären können. Zunächst könnten Rafts als Membranrezeptor für Gag und dessen Assemblierung notwendig sein. Ein Hinweis, der diese These unterstützt, ist die oben erwähnte lösliche Lokalisation von Gag-EGFP nach Verminderung der Reggie-Protein

Expression und die Auswirkungen der Cholesterol-Depletion. Zusätzlich könnten Rafts die korrekte Assemblierung von Gag durch die herabgesetzte laterale Beweglichkeit von Proteinen innerhalb dieser Strukturen unterstützen. Durch die Zusammensetzung von Rafts könnte weiterhin die Membranfusion während des Abschnürens von Partikeln beeinflusst werden. Eine weitere HIV-Komponente gibt Hinweise auf die Notwendigkeit von Rafts für den HIV-Replikationszyklus. Das virale Protein Nef steigert in HIV-infizierten Zellen die Synthese von Cholesterol und scheint dieses Molekül zur Plasmamembran zu transportieren, eine Raft-Assoziation von Nef konnte in Jurkat-Zellen gezeigt werden [Wang *et al.* 2000, Zheng *et al.* 2003]. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass es eine Vielzahl von Raft-Typen gibt, die bezüglich ihrer strukturellen Zusammensetzung gemeinsame Grundvoraussetzungen erfüllen, hinsichtlich ihrer Funktion und ihres biochemischen Verhaltens jedoch unterschiedlich sind.

Der molekulare Vorgang, in dem Gag letztlich zu Plasmamembran-Rafts infizierter CD4<sup>+</sup>-Zellen transportiert wird, ist zur Zeit noch nicht aufgeklärt. Auch die Frage, ob die Oligomerisierung von Gag im Zytosol oder erst nach Membranbindung stattfindet, wird kontrovers diskutiert. Es kann die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Gag die Bindung an Reggie-2 nutzen kann, um zur Plasmamembran transportiert zu werden, und somit die geordnete Bildung von Partikeln gewährleistet ist. Die Tatsache, dass es sich bei Hrs und der ESCRT-Komponente um Proteine handelt, die keine bekannten Raft-Lokalisationssignale enthalten, und die in dieser Arbeit erstmalig beschriebene Kolo-kalisation eines Raft-assoziierten Proteins mit TSG101 und Hrs unterstützen diese These. Dabei ist bemerkenswert, dass überexprimiertes Reggie-2-myc und TSG101-FLAG zu einem großen Anteil den der Plasmamembran von HeLa-Zellen kolo-kalisieren (siehe Abb. 3.10), da für das fast ausschliesslich im Cytosol vorliegende Protein TSG101 bisher keine physiologische Funktion an dieser Membran beschrieben wurde. Eine aktuelle Studie beschreibt allerdings für HRS, das ebenfalls hauptsächlich intrazellulär eine Rolle spielt, eine neue Funktion beim Recycling endozytierter Signalrezeptoren. In diesen Transportprozess zwischen endosomalen Kompartimenten und der Plasmamembran scheint allerdings keine ESCRT-Komponente involviert zu sein [Hanyaloglu *et al.* 2005]. Aufgrund ihres Verhaltens in Dichtegradienten und dem Fehlen klassischer Raft-

Marker in Gag-DRMs [Lindwasser und Resh, 2001, Ding *et al.* 2003] ist denkbar, dass Reggie-Rafts einen eigenen Typus dieser Domänen darstellen, der bei HIV-infizierten Zellen durch Gag mit definiert wird.

### **4.2.3 Reggie-2-Überexpression erhöht die Plasmamembran-Lokalisation von Gag**

Bei der Assemblierung viraler Partikel in infizierten Zellen nutzen Viren zelluläre Mechanismen aus, da sie nur über ein stark eingeschränktes Proteinrepertoire verfügen und ohne Wirtszelle nicht replikationsfähig sind.

In dieser Arbeit wurden Epitop-markierte Reggie-2-Varianten hergestellt, die es zum einen erlauben, die Lokalisation des Proteins unabhängig der Einschränkungen kommerziell verfügbarer Reggie-2-Antikörper in Immunfluoreszenz-Studien zu analysieren, und zum anderen durch Überexpression Rückschlüsse auf funktionelle Aspekte des Proteins ziehen zu können. Dabei ist bemerkenswert, dass nach Expression in Zelllinien im Gegensatz zu Reggie-1 die Markierung von Reggie-2 am C- oder am N-Terminus zu einer unnatürlichen Aggregation des Proteins im Zellinneren führt. Die Anbringung einer HA-Epitop-Markierung innerhalb der Aminosäuresequenz von Reggie-2 wurde beschrieben [Morrow *et al.* 2002], im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich ein Konstrukt hergestellt, durch das nach Expression ein an gleicher Stelle mit myc-Epitop versehenes Reggie-2 vorliegt. Beide Konstrukte zeigten nach Expression in HeLa-Zellen einen im Vergleich zum endogenen Protein etwa verdoppelten Reggie-2-Gehalt, aberrante Effekte durch diese leichte Überexpression sind daher eher unwahrscheinlich. Reggie-Proteine sind Raft-lokalisiert, diese Mikrodomänen existieren sowohl an der Plasmamembran als auch an endosomalen Strukturen innerhalb der Zelle. Beide Epitop-markierten Reggie-Varianten zeigten eine generell erhöhte Lokalisation an diesen Kompartimenten und es ist wahrscheinlich, dass durch die Überexpression entweder die Anzahl an Rafts erhöht wurde, oder dass durch die beschriebene Bindung von Reggie-1 an Reggie-2 die Größe der Oligomere an der Plasmamembran zunimmt. Die in der Einleitung angesprochene und sinnvoll



erscheinende Definition von Kusumi *et al.*, die ein minimales Lipid Raft als einen Komplex von mindestens drei Komponenten beschreibt, macht wahrscheinlich, dass in den Membranen von Zellen eine Vielzahl verschiedener Raft-Typen existieren, die neben den prinzipiellen Strukturkomponenten spezialisierte Proteine enthalten, die dem Komplex eine Funktion geben. Ausgehend von dieser These soll hier der Begriff der Reggie-Rafts definiert werden, also Lipid Rafts, die durch Reggie-Proteine Funktionen für die Zelle ausüben, die im Einzelnen noch zu klären sind. Durch die verschiedenen zellulären Mechanismen wie Insulin-Signaltransduktion oder T-Zell-Aktivierung, mit denen Reggie-Proteine bislang in Verbindung gebracht wurden, liegt die Vermutung nahe, dass Reggie eine Adaptorfunktion haben, grössere funktionelle Komplexe über multiple Bindungen zusammenführen und in Rafts lokalisieren.

Die generierte Reggie-2-myc-Variante zeigte in der Immunfluoreszenz neben der Membranständigkeit eine relativ gleichmässige Verteilung über die jeweiligen Zellen, die darauf hindeutet, dass dieses Protein zu einem gewissen Anteil löslich ist. Da die dreidimensionale Struktur von Reggie-2 bislang nicht aufgeklärt ist, ist anzunehmen, dass der Ort der Markierung und die bedingte Konformationsänderung einen geringen Einfluss auf die Löslichkeit hat. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass, ebenfalls konformationsbedingt, andere Proteine an die myc-Variante binden und so deren teilweise zu beobachtende Löslichkeit bedingen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass durch die Überexpression nicht alle Reggie-2 Moleküle palmitoyliert sind. Ungeachtet dessen zeigten beide Varianten eine starke Kolo-kalisation mit HIV Gag und neben der stärkeren Präsenz von Reggie-2 an der Plasmamembran war auch Gag-EGFP dort nach Koexpression stärker vertreten. Die Translokation von Gag zur Plasmamembran nach Reggie-2 Überexpression ist somit ein weiterer Hinweis auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine, der Plasmamembran-assoziierte Anteil von Gag-EGFP stieg zusammen mit Reggie-2 an.

Die Expression der Deletionsmutante Reggie-2<sub>328-428</sub>, die keine Interaktion mit Gag zeigte, hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von Gag. Die vorhergesagte *coiled coil*-Domäne von Reggie-2 [Liu *et al.* 2005], eine Struktur, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann, scheint also nicht für Bindung an Gag relevant zu sein.

### 4.3 Integration von zellulären Proteinen in HIV-Partikel

Viren verfügen über keinen eigenen Stoffwechsel und sind bei der Replikation auf zelluläre Faktoren angewiesen. Je besser die Anpassung an den Wirt, umso erfolgreicher ist das Virus im Sinne der Produktivität einer Infektion. Das Humane Immundefizienz-Virus enthält sowohl in der Hülle als auch im Inneren zelluläre Proteine. Für die meisten dieser Proteine ist deren Funktion im Zusammenhang mit dem viralen Replikationszyklus bisher nicht bekannt. Es ist jedoch wichtig, diese Zusammenhänge aufzuklären und weitere Wirtskomponenten zu identifizieren, die mit dem Virus interagieren, da durch ein besseres Verständnis der HIV-Pathogenese neue Strategien gegen die Infektion oder bessere Behandlungsmöglichkeiten bereits infizierter Personen möglich sind.

Die Schwierigkeit bei der Identifikation tatsächlich relevanter zellulärer Proteine in Virus-Präparationen liegt darin, dass die Möglichkeit der Verunreinigung der Präparation durch Protein-beladene Vesikel besteht [Bess *et al.* 1997, Gluschankof *et al.* 1997]. Es muss daher durch weiterführende Experimente gezeigt werden, dass ein jeweiliges Protein tatsächlich mit dem Virus interagiert und nicht nur als Kontamination vorliegt; ein Beispiel für letzteren Fall ist das Hitzeschock-Protein Hsp60, das an die Außenseite der Virushülle adhäriert, ohne im Replikationszyklus von HIV eine Rolle zu spielen [Ott *et al.* 2000]. Selbst bei tatsächlich in das Virus integrierten Wirtproteinen muss bestimmt werden, ob eine physiologische Rolle gegeben ist oder die Integration unspezifisch ist. So finden sich in der Hülle von T-Zellen-entstammender Viren Histokompatibilitäts-Antige (HLA) der Klasse I und II, Zelladhäsionsproteine (ICAM 1 bis 3) und eine Vielzahl der *cluster of differentiation*-Marker (CD), für die zum Teil Funktionen im Virus beschrieben worden sind, die andererseits aber auch in grosser Anzahl auf der Plasmamembran von T-Zellen vorhanden sind [Übersicht in Ott 1997]. Die hohe Anzahl der Moleküle auf der Zelloberfläche und deren gleichmässige Verteilung kann zu deren Integration in die Virusmembran beim Abschnüren der Partikel führen. Oder aber es findet wie im Fall von ICAM-1 eine Integration über direkte Interaktion des Proteins mit HIV Gag statt [Beauséjour *et al.* 2004]. Der Einbau von ICAM-1 in Virus-Partikel ist für die Produktion von HIV nicht notwendig, die Infektiösität der resultierenden Partikel erhöht sich jedoch *in*

*vivo* um den Faktor 5 bis 95, abhängig von der Expression des ICAM-1-Liganden LFA-1 auf der Zielzelle [Fortin *et al.* 1997]. Ebenso ist die Inkorporation von HLA-II, die über eine Bindung an das Env-Protein vermittelt wird, nicht unbedingt notwendig für die Bildung infektiöser Partikel. HLA-II hat jedoch eine wichtige Auswirkung auf die Pathogenese der AIDS-Erkrankung. Das Protein dient im physiologischen Zusammenhang der Präsentation von Antigenen, was nach Bindung an den T-Zell-Rezeptor CD4-positiver Lymphozyten zur T-Zell-Aktivierung und Teilung führt. Ohne die physiologischen Sekundärsignale führt diese Bindung von HLA-II an T-Zellen allerdings zu deren Apoptose. In diesem Sinn führt die Präsenz von HLA-II auf der Virusoberfläche zur Reduktion der Immunantwort des Wirts [Arthur *et al.* 1992].

Ein weiterer Faktor ist die Zelltyp-abhängige Integration von zellulären Proteinen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung der Virushülle beim Passagieren durch verschiedene Zelllinien ändert [Bastiani *et al.* 1997]. Diese Studie bezog sich allerdings nur auf Oberflächenproteine wie HLA-Moleküle und interzelluläre Adhäsionsproteine (ICAM). Bisher wurde allerdings kein zelluläres Membran-assoziiertes Protein beschrieben, welches *in vitro* für die virale Replikation in Zelllinien absolut notwendig ist. Es kann jedoch vor dem Hintergrund der hohen Dynamik der viralen Population in einem Individuum nicht ausgeschlossen werden, dass einige dieser Moleküle Effekte *in vivo* zeigen. Die Latenzphase einer HIV-Infektion galt lange Zeit als Periode viraler Inaktivität, es zeigte sich jedoch, dass in diesem Zeitraum eine grosse Anzahl von Zellen infiziert wird und der Umsatz an gebildetem Virus entsprechend hoch ist. Durch die relativ hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase kommt es schnell zu einer Anhäufung genetisch diverser Viruspopulationen in einem infizierten Organismus. Geringe Änderungen des HIV-Genoms können dabei in Vorteilen gegenüber der Immunabwehr oder einer gesteigerten Infektiösität resultieren.

Generell werden drei Möglichkeiten der Inkorporation zellulärer Proteine in umhüllte Viren unterschieden: Zufälliger Einbau, physikalische Interaktion mit einem viralen Protein und eine funktionelle Inkorporation. Eine Variante der letzt genannten Möglichkeit besteht darin, dass bestimmte Protein eine Funktion für das Virus erfüllen, in dem sie eben nicht in das Partikel integriert werden. Der Einbau des HIV-Rezeptors CD4 und der Korezeptoren CCR5 oder CXCR4

könnten dazu führen, dass extrazellulär Viren fusionieren und nicht mehr produktiv infizieren können. Tatsächlich findet man diese Moleküle nicht oder nur sehr gering vertreten in der viralen Membran [Lallos *et al.* 1999]. Die genauen molekularen Zusammenhänge dieser Exklusion sind nicht geklärt, es muss jedoch hinzugefügt werden, dass das akzessorische Nef-Protein von HIV für die gesteigerte Endozytose und Degradation dieser Proteine in infizierten Zellen verantwortlich ist [Michel *et al.* 2005]. Durch diesen Mechanismus wird zusätzlich eine Superinfektion verhindert. Weiterhin können Proteine durch sterische Hinderung von der Inkorporation ausgeschlossen sein, so wird beispielsweise für CD45 angenommen, dass es aufgrund einer grossen zytoplasmatischen Domäne zu der Gag-Packungsmaschinerie inkompatibel ist [Esser *et al.* 2001].

Für einige zelluläre Komponenten wurde deren Notwendigkeit für eine produktive HIV-Infektion beschrieben. Ein Beispiel dafür ist die Peptidyl-Prolyl Isomerase Cyclophilin A, deren Funktion für das Virus zur Zeit kontrovers diskutiert wird. Cyclophilin A (CypA) wurde ursprünglich als das zelluläre Ziel für das Pilztoxin Cyclosporin A identifiziert, welches die Bildung von Interleukin-2 unterdrückt und daher als immunsuppressive Substanz Verwendung findet [Handschumacher *et al.* 1984]. Der Einbau von CypA in virale Partikel wird über die Bindung an einen Prolin-Rest in der Kapsid-Domäne von Gag vermittelt. In Bezug auf HIV wurde postuliert, dass CypA nach dem Eintritt des Virus in die Zelle zu der Entfaltung des Genom-tragenden Viruskerns beiträgt [Luban 1996]. Die Inkorporation von CypA in HIV-Partikel scheint für eine produktive Infektion notwendig zu sein [Franke *et al.* 1994, Thali *et al.* 1994, Ott *et al.* 1995]. Wichtig ist dabei allerdings nicht die Isomerase-Aktivität des Enzyms [Saphire *et al.* 2002]. Stattdessen bezieht sich die Notwendigkeit der CypA-Inkorporation auf Restriktionsfaktoren, die von vielen Säugerspezies exprimiert werden und eine gewisse Resistenz gegen Infektionen durch Retroviren verleihen. Die genaue Funktion des in Menschen als Ref-1 bezeichneten Faktors ist unbekannt, und die Resistenz-verleihende Wirkung kann durch die Virusanzahl abgesättigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die HIV-Sensitivität gegenüber Ref-1 von Cyclophilin A abhängt, da die Infektiosität des Virus um den Faktor 100 steigt,

wenn die Bindung von CypA an das HIV Kapsid unterbunden wird [Towers *et al.* 2003].

Die Interaktion von HIV mit zellulären Proteinen ist nicht unbedingt mit einem Vorteil für das Virus verbunden, so zum Beispiel im Fall von Mitgliedern der APOBEC-Protein-Familie. Bei APOBEC-Proteinen (*Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme*) handelt es sich um Cytosin-Deaminasen, wobei hauptsächlich APOBEC3F und APOBEC3G in virale Partikel eingebaut werden und nach der Neuinfektion einer Zelle bei der Synthese des retroviralen Minus-DNA-Strangs zu einer Akkumulation von Uracil führen. Die Reverse Transkriptase erkennt Uracil als Thymin und baut so Adenin statt Guanin in den sekundären Plus-DNA-Strang ein, was zu einer enormen Anhäufung von Mutationen im viralen Genom führt. Die molekularen Vorgänge der Inkorporation sind noch nicht abschliessend geklärt. Sowohl APOBEC-Proteine als auch Gag sind in der Lage, RNA zu binden, und es gibt Hinweise, dass der Einbau von APOBEC3G in HIV-Partikel über einen Komplex aus APOBEC3G, viraler RNA und Gag vermittelt wird, der keiner direkten Interaktion zwischen den beiden Proteinen bedarf und durch RNase A unterbunden wird [Svarovskaia *et al.* 2004]. Andere Gruppen hingegen machten eine Domäne im Nukleokapsid-Teil von Gag für eine direkte Interaktion mit APOBEC3G verantwortlich [Alce *et al.* 2004, Cen *et al.* 2004]. Unbestritten ist jedoch die Tatsache, dass dieses zelluläre Protein in HIV-Partikel integriert wird. Eine virale Gegenmassnahme gegen die Deamination wird durch das akzessorische Protein Vif (Viraler Infektivitäts-Faktor) vermittelt, dessen Expression zur Polyubiquitylierung von APOBEC-Proteinen und somit zu deren Degradation führt [Marin *et al.* 2003, Stopak *et al.* 2003].

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass zelluläre Proteine den HIV-Replikationszyklus in verschiedenster Weise beeinflussen. Die Identifikation neuer Interaktionspartner von HIV-Proteinen ist daher zum einen wichtig für das Verständnis des Virus, zum anderen können sich aus diesen Interaktionen Hinweise auf physiologische Funktionen von zellulären Proteinen ergeben. Dies ist insbesondere für solche Proteine interessant, deren zelluläre Funktion wie im Fall der Reggie-Proteine noch nicht geklärt ist. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kollokalisationsstudien von Reggie-2 mit Proteinen des ESCRT-Systems und dessen beschriebene Rolle in der HIV-Replikation lassen

die Vermutung zu, dass neben dem viralen Kontext eine funktionelle Verbindung von Reggie-Proteinen mit der Sortierung von Proteinen in MVBs bestehen könnte. Die Rolle von Rafts in der MVB-Sortierung von Proteinen ist noch nicht geklärt, die Raft-bedingte verlangsamte laterale Beweglichkeit von Proteinen erscheint jedoch auch für diesen Prozess sinnvoll.

### **4.4 Effekte der Reggie-2-Expression auf Gag**

#### **4.4.1 Herabregulierung von Reggie-2 erhöht die Freisetzung von VLP**

Die siRNA-vermittelte Herabregulierung von Reggie-2 zeigte interessante Ergebnisse bezüglich der Freisetzung virusähnlicher Partikel. Zunächst war angenommen worden, dass die potentielle Transportfunktion von Reggie-2 für Gag durch die Herabregulierung unterbunden würde. Es zeigte sich jedoch, dass die Produktion von VLP signifikant anstieg. Dadurch stellt sich erneut die Frage nach einer potentiellen Rolle von Reggie-2 für die Assemblierung von HIV. In den HeLa-Zellen, in denen die Expression beider Reggie-Proteine vermindert war, zeigte Gag eine drastisch veränderte Lokalisation. Im Gegensatz zu den Kontroll-Zellen lag Gag in mikroskopischen Studien hauptsächlich zytoplasmatisch in diesen Zellen vor. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die Raft-Assoziation von Gag durch Reggie-2 mit vermittelt wird. Unklar bleibt jedoch, wodurch die erhöhte Partikelfreisetzung nach Verminderung der Reggie-Expression zustande kommt. Interessanterweise führt jedoch die Expression einer PS/TAP-Mutante von Gag in Cholesterol-depletierten 293T-Zellen zu einem ähnlichen Ergebnis. Wie in Abschnitt 1.4.3 beschrieben, führen Mutationen in diesem als L-Domäne bezeichneten Motif zu einem Arrest der Virusabschnürung in einer späten Phase und somit zu einer starken Reduktion der Partikelproduktion. Wird Cholesterol jedoch durch M $\beta$ CD oder Statine depletiert, scheint der Prozess der Freisetzung unabhängig von der L-Domäne abzulaufen. Obwohl viele Studien zeigen, dass Cholesterol-Depletion in infizierten Zellen die produktive Virus-Freisetzung stark herabsetzt, konnte für (PS/TAP<sup>-</sup>)-Partikel gezeigt werden, dass die Freisetzung im Vergleich zum Wildtyp-Virus um den Faktor 2,5 zunimmt [Ono und Freed,

2001]. Da durch das PS/TAP-Motif die Bindung von Gag an TSG101 gegeben ist, ist eine Rolle von Reggie-2 als Bindeglied zwischen Rafts und dem ESCRT-System möglich. Zu untersuchen sind allerdings Effekte, die sich durch die Herabregulierung von Reggie-Proteinen für die Zelle und deren Physiologie ergeben. So scheint das Gangliosid GM1 nach der Verminderung von Reggie-Proteinen nicht mehr in Rafts der Plasmamembran vorzuliegen [Richter und Tikkanen, nicht veröffentlicht]. Die molekularen Zusammenhänge dieser Beobachtung sind noch nicht geklärt, zumindest Reggie-1 besitzt jedoch eine putative Cholesterol-Bindestelle, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnte [Neumann-Giesen und Tikkanen, nicht veröffentlicht]. Im Gegensatz zu Reggie-Proteinen führt eine Verminderung der TSG101-Expression zu einer stark herab-gesetzten Partikelproduktion [Stuchel *et al.* 2004]. Da im Rahmen dieser Arbeit keine direkte Interaktion von TSG101 mit Reggie-Proteinen untersucht wurde, bleibt zu klären, ob eine solche Interaktion vorliegt.

#### 4.4.2 HIV Gag, Reggie-2 und das ESCRT-System

Exosomen wurden zunächst in Reticulozyten beschrieben, die sich während ihrer Differenzierung zu Erythrozyten über die Sekretion dieser Vesikel des Transferrinrezeptors entledigen [Pan *et al.* 1983]. Die Sekretion von Exosomen wurde auch für andere Zelltypen beschrieben, so werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) über diesen Weg MHC-Klasse I und II Moleküle sowie CD86 an das umgebende Milieu abgegeben [Raposo *et al.* 1996]. Da diese Faktoren in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren, sieht man die Funktion von Exosomen heute nicht mehr nur in der Entledigung überflüssiger Proteine, sondern spricht ihnen eine Rolle in der interzellulären Kommunikation zu. Exosomen schnüren intrazellulär in das Lumen eines endosomalen Kompartimentes ab, das als *multivesicular body* (MVB) bezeichnet wird. Bei dessen Verschmelzung mit der Zellmembran werden die Exosomen an die Umgebung der Zelle abgegeben. Der Sortiervorgang von Proteinen in MVB ist teilweise aufgeklärt und involviert Proteine der ESCRT-Komplexe I bis III [Katzmann *et al.* 2002].

Die Exozytose über MVBs kann von Viren dazu genutzt werden, infizierte Zellen zu verlassen. Im Fall von HIV-1 ist die Assemblierung und Abschnürung neuer Partikel bis vor wenigen Jahren nur für T-Zellen untersucht worden, da sie die überwiegenden Zielzellen einer Infektion darstellen und für den Verlauf einer HIV-1-assoziierten Erkrankung massgeblich sind. In diesem Zelltyp findet die Ausschleusung neuer Partikel über Lipid Rafts der Plasmamembran statt. Für Makrophagen, die ebenfalls durch das Virus infiziert werden können, war der Ort der Ausschleusung lange nicht geklärt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten dann vor wenigen Jahren zeigen, dass HIV innerhalb dieser Zellen in MHC Klasse II-Kompartimenten akkumuliert und dass HIV-Partikel das MHC-II-Molekül HLA-DR enthalten. Teilweise enthielten diese Kompartimente bereits elektronendichte, gereifte Partikel; bei der Infektion von T-Zellen findet der als Reifung bezeichnete Vorgang der proteolytischen Spaltung der Vorläuferproteine Gag und Env erst ausserhalb der Zelle statt [Raposo *et al.* 2002].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HIV-1 Gag mit Reggie-2 in intrazellulären Kompartimenten kolokalisiert. Für Hela-Zellen wurde schon früher beschrieben, dass die Expression von Gag zu dessen Assemblierung in solchen intrazellulären Kompartimenten führt. Immunfärbungen und Analyse mittels Elektronen- und konfokaler Lichtmikroskopie identifizierten diese Kompartimente als späte Endosomen und MVB; Gag war weder in frühen Endosomen, noch in Recycling-Endosomen oder dem Trans-Golgi-Netzwerk enthalten [Sherer *et al.* 2003]. Gag ist also nicht zufällig an intrazellulären Membranen lokalisiert, sondern wird gezielt zu späten Endosomen transportiert. Diese Ergebnisse konnten auch für andere Zelltypen wie primäre embryonale Mausfibroblasten verifiziert werden. Die Aufnahme von HIV in MVB wird über eine Interaktion von Gag mit dem ESCRT-I-Protein TSG101 vermittelt, wobei Gag die TSG101-Rekrutierungsfunktion von HRS imitiert. Gag verfügt in der p6-Domäne über ein PS/TAP-Motiv, dessen Mutation die Assemblierung von HIV an MVB verhindert. Das gleiche Motiv sorgt in HRS für die Bindung an TSG101 und Gag ist so in der Lage, die TSG101-Rekrutierungsfunktion von HRS zu imitieren [Pornillos *et al.* 2003]. Durch die partielle Kolokalisation von Reggie-2 mit TSG101 und HRS (siehe Abbildung 3.10) erscheint eine Rolle von Reggie-2 beim Abschnüren von HIV Partikeln in MVB möglich. Unterstützt wird diese Hypothese



durch die Tatsache, dass Reggie-2 in Maus-Makrophagen überwiegend in intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist (siehe Abbildung 3.7 B). In eben diesen Zellen findet die Ausschleusung neu gebildeter Viren ausschliesslich über MVBs statt. Dagegen sind Reggie-Proteine in T-Zellen, in denen HIV ausschliesslich über die Plasmamembran abschnürt, ebenfalls an der gleichen Membran lokalisiert wie assemblierendes Virus. Ob es sich bei den intrazellulären, Reggie-2 positiven Strukturen in Maus-Makrophagen um MVBs handelt, ist allerdings noch zu untersuchen. Da eine Rolle von Rafts bei der Assemblierung von Gag an der Plasmamembran und dem Abschnüren von Partikeln mittlerweile anerkannt ist, ergibt sich die Möglichkeit, dass Reggie-Proteine zusammen mit anderen Komponenten einen Raft-Typ in MVBs definieren. Wie bereits erwähnt, wurde weder für Hrs noch für TSG101 eine Raft-Lokalisation beschrieben. Ein Vorkommen von Mikrodomänen in MVBs erscheint allerdings denkbar, um die geordnete Sortierung von Proteinen zu gewährleisten. Neben dem ESCRT-System konnte zumindest für 293T Zellen gezeigt werden, dass auch das Adaptorprotein AP-3 eine Rolle für die Assemblierung von Gag an MVBs spielt. Gag bindet an die  $\delta$ -Untereinheit des AP-3-Komplexes; wird diese Interaktion unterbunden, werden keine Partikel mehr über die MVBs von Gag-transfizierten 293T Zellen entlassen [Dong *et al.* 2005].

### 4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie stellen eine neue Verbindung zwischen dem essentiellen Strukturprotein eines humanpathogenen Virus und einem zellulären, Raft-assoziierten Protein her. Die genaue molekulare Funktion von Reggie ist weiterhin nicht bekannt. Reggie-Proteine scheinen in eine Reihe verschiedenster molekularer Vorgänge involviert zu sein, und es stellt sich die Frage, ob diesen Vorgängen ein gemeinsames Muster zugrunde liegt. Eine mögliche Funktion, die es zu untersuchen gilt, ist die eines Raft-assoziierten Adaptor- oder Transport-Proteins, welches andere zelluläre Komponenten in diese Signal- und Sortierplattformen rekrutiert. Die Konstrukte, die für diese Studie hergestellt wurden, und die sowohl die Überexpression als auch die verminderte Expression von Reggie-2 erlauben, können in Zukunft dazu benutzt werden, Auswirkungen

auf Vorgänge zu untersuchen, für die eine Verbindung zu Reggie-Proteinen beschrieben wurde. Besonders interessant erscheint dabei die starke Expression und relativ klar definierte Lokalisation von Reggie-Proteinen in Lymphozyten, insbesondere im Hinblick auf die Interaktion von Reggie-2 mit dem T-Zell-tropen HI-Virus. In diesem Zusammenhang könnte die weitere Untersuchung dieser Interaktion in anderen Zelltypen wichtige Rückschlüsse sowohl auf die Funktion von Reggies als auch die Pathogenese von HIV liefern. So ist z.B. zu klären, ob die überwiegend intrazelluläre Lokalisation von Reggie-2 in Makrophagen in einem Zusammenhang mit der Tatsache steht, dass HIV in diesem Zelltyp ausschliesslich über den endosomalen MVB-Weg abgeschnürt wird.

Eine weitere wichtige Frage, die zu beantworten bleibt, bezieht sich auf die Infektiösität von Viren, die Reggie-depletierten Zellen entstammen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Interaktion von Gag mit Reggie-2 essentiell für die Bildung produktiver Viren ist. Bedingt durch die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase und dem gerade in der Anfangsphase einer Infektion enorm hohen Umsatz von Viren würden sich in einem infizierten Organismus innerhalb kurzer Zeit Viruspopulationen entwickeln, die der durch Gag-Reggie-2-Bindung verlangsamten Freisetzung entkommen würden. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden, ob nicht genau dies der Fall ist. Es sind Experimente notwendig, die die Auswirkung der Reggie-2-Expressionsverminderung im viralen Gesamtkontext berücksichtigen. Dazu wäre es notwendig, die Auswirkungen beispielsweise siRNA-vermittelter Herabregulation von Reggie-Proteinen in infizierten primären Zellen zu untersuchen. Aufgrund der Sicherheitseinstufung solcher Experimente konnte diese Frage im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden.

Ein weiterer Punkt, der der Klärung auf molekularer Ebene bedarf, ergibt sich aus der Tatsache, dass sich nur die siRNA-vermittelte Verminderung der Reggie-1 Expression auf beide Reggie-Proteine auswirkt. Ob dabei die Hetero-oligomerisierung der beiden Proteine, in Zusammenhang mit der Lipidmodifikation-bedingten stärkeren Membran-Assoziation von Reggie-1, eine Rolle spielt, bleibt zu klären.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Alce, T. M., and Popik, W. (2004). APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem* **279**: 34083-34086.
2. Aloia, R. C., Tian, H., and Jensen, F. C. (1993). Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5181-5185.
3. Arthur, L. O., Bess, J. W., Jr., Sowder, R. C., 2nd, Benveniste, R. E., Mann, D. L., Chermann, J. C., and Henderson, L. E. (1992). Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* **258**: 1935-1938.
4. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871.
5. Bastiani, L., Laal, S., Kim, M., and Zolla-Pazner, S. (1997). Host cell-dependent alterations in envelope components of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **71**: 3444-3450.
6. Baumann, C. A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P. E., Pessin, J. E., and Saltiel, A. R. (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**: 202-207.
7. Beausejour, Y., and Tremblay, M. J. (2004). Interaction between the cytoplasmic domain of ICAM-1 and Pr55Gag leads to acquisition of host ICAM-1 by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **78**: 11916-11925.
8. Bess, J. W., Jr., Gorelick, R. J., Bosche, W. J., Henderson, L. E., and Arthur, L. O. (1997). Microvesicles are a source of contaminating cellular proteins found in purified HIV-1 preparations. *Virology* **230**: 134-144.
9. Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., and Lodish, H. F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem* **272**: 13793-13802.
10. Borner, G. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., Macaskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S., and Dupree, P. (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* **137**: 104-116.
11. Bouamr, F., Scarlata, S., and Carter, C. (2003). Role of myristylation in HIV-1 Gag assembly. *Biochemistry* **42**: 6408-6417.
12. Brown, D. A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 111-136.
13. Cen, S., Guo, F., Niu, M., Saadatmand, J., Deflassieux, J., Kleinman, L. (2004). The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* **279**: 33177-33184.
14. Centers for Disease Control (1982). A cluster of Kaposi sarcoma and pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. *MMWR* **31**: 305-307.
15. Chamberlain, L.H., Burgoyne, R.D., Gould, G.W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5619-5624.

16. Cho, Y. J., Chema, D., Moskow, J. J., Cho, M., Schroeder, W. T., Overbeek, P., Buchberg, A. M., and Duvic, M. (1995). Epidermal surface antigen (MS17S1) is highly conserved between mouse and human. *Genomics* **27**: 251-258.
17. Clague, M. J., and Urbe, S. (2003). Hrs function: viruses provide the clue. *Trends Cell Biol* **13**: 603-606.
18. Colgan, J., Yuan, H. E., Franke, E. K., and Luban, J. (1996). Binding of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein to cyclophilin A is mediated by the central region of capsid and requires Gag dimerization. *J Virol* **70**: 4299-4310.
19. de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* **102**: 4336-4344.
20. de Gassart, A., Geminard, C., Hoekstra, D., and Vidal, M. (2004). Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? *Traffic* **5**: 896-903.
21. Deininger, S. O., Rajendran, L., Lottspeich, F., Przybylski, M., Illges, H., Stuermer, C. A., and Reuter, A. (2003). Identification of teleost Thy-1 and association with the microdomain/lipid raft reggie proteins in regenerating CNS axons. *Mol Cell Neurosci* **22**: 544-554.
22. Demirov, D. G., Orenstein, J. M., and Freed, E. O. (2002). The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. *J Virol* **76**: 105-117.
23. Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G., and Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem* **276**: 18507-18512.
24. Dietrich, C., Volovyk, ZN., Levi, M., Thompson, NL., Jacobson, K. (2001). Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10517-10518.
25. Ding, L., Derdowski, A., Wang, J. J., and Spearman, P. (2003). Independent segregation of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein complexes and lipid rafts. *J Virol* **77**: 1916-1926.
26. Dong, X., Li, H., Derdowski, A., Ding, L., Burnett, A., Chen, X., Peters, T. R., Dermody, T. S., Woodruff, E., Wang, J. J., and Spearman, P. (2005). AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* **120**: 663-674.
27. Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, FC., Schedl, A., Haller, H., Kurzchalia, TV. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**: 2404-2405.
28. Dremina, E. S., Sharov, V. S., and Schoneich, C. (2005). Protein tyrosine nitration in rat brain is associated with raft proteins, flotillin-1 and alpha-tubulin: effect of biological aging. *J Neurochem* **93**: 1262-1271.
29. Edgar, A. J., and Polak, J. M. (2001). Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals. *Int J Biochem Cell Biol* **33**: 53-64.
30. Edidin, M. (2003). Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 414-418.
31. Eis-Hubinger, AM., Mohr, K., Schneeweis, KE. (1991). Different mechanisms of protection by monoclonal and polyclonal antibodies during the course of herpes simplex virus infection. *Intervirology* **32**: 351-360.
32. Elbashir, SM., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001 a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 428-429.
33. Elbashir, SM., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001 b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**: 188-200.

34. Esser, M. T., Graham, D. R., Coren, L. V., Trubey, C. M., Bess, J. W., Jr., Arthur, L. O., Ott, D. E., and Lifson, J. D. (2001). Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation. *J Virol* **75**: 6173-6182.
35. Field, KA., Holowka, D., Baird, B. (1995). Fc epsilon RI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9201-9205.
36. Fields Virology (2001). Lippincott Williams & Wilkins. Vierte Auflage. ISBN 0-7817-1832-5
37. Fortin, J. F., Cantin, R., Lamontagne, G., and Tremblay, M. (1997). Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* **71**: 3588-3596.
38. Franke, E. K., Yuan, H. E., and Luban, J. (1994). Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**: 359-362.
39. Friedrichson, T., Kurzchalia, TV. (1998). Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**: 802-805.
40. Galbiati, F., Razani, B., and Lisanti, M. P. (2001). Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* **106**: 403-411.
41. Galbiati, F., Volonte, D., Goltz, J. S., Steele, Z., Sen, J., Jurcsak, J., Stein, D., Stevens, L., and Lisanti, M. P. (1998). Identification, sequence and developmental expression of invertebrate flotillins from *Drosophila melanogaster*. *Gene* **210**: 229-237.
42. Gallo, RC., Salahuddin, SZ., Popovic, M., Shearer, GM., Kaplan, M., Haynes, BF., Palker, TJ., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., et al. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**: 500-503.
43. Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L., et al. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**: 55-65.
44. Gerber, SH., Sudhof, TC. (2002). Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* **51 Suppl1**: S3-11.
45. Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., and De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**: 103-112.
46. Gkantiragas, I., Brugger, B., Stuken, E., Kaloyanova, D., Li, X. Y., Lohr, K., Lottspeich, F., Wieland, F. T., and Helms, J. B. (2001). Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol Biol Cell* **12**: 1819-1833.
47. Gluschankof, P., Mondor, I., Gelderblom, H. R., and Sattentau, Q. J. (1997). Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations. *Virology* **230**: 125-133.
48. Gottlinger, HG., Dorfman, T., Cohen, EA., Haseltine, WA. (1993). Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7381-7385.
49. Graham, DR., Chertova, E., Hilburn, JM., Arthur, LO., Hildreth, JE. (2003). Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. *J Virol* **77**: 8237-8248.

50. Gruenberg, J., Maxfield, FR. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7: 552-563.
51. Haglund, K., Ivankovic-Dikic, I., Shimokawa, N., Kruh, G. D., and Dikic, I. (2004). Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neurites. *J Cell Sci* 117: 2557-2568.
52. Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of Escherichia coli. *DNA Cloning, Volume 1, a practical approach* (Glover, DM; Hrsg) 109-135.
53. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. (1984). Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226: 544-547.
54. Hanyaloglu, AC., McCullagh, E., von Zastrow, M. (2005). Essential role of HRS in a recycling mechanism mediating functional resensitization of cell signaling. *EMBO J* 24: 2265-2283.
55. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141: 929-942.
56. Hay, JC., Fiset, PL., Jenkins, PH., Fukami, K., Takenawa, C., Anderson, RA., Martin, TF. (1995). ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca(2+)-activated secretion. *Nature* 374: 173-177.
57. Hazarika, P., McCarty, M. F., Prieto, V. G., George, S., Babu, D., Koul, D., Bar-Eli, M., and Duvic, M. (2004). Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer Res* 64: 7361-7369.
58. Hermida-Matsumoto, L., and Resh, M. D. (2000). Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. *J Virol* 74: 8670-8679.
59. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59.
60. Holm, K., Weclawicz, K., Hewson, R., and Suomalainen, M. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55(gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100. *J Virol* 77: 4805-4817.
61. Hope, HR., Pike, LJ. (1996). Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* 7: 843-851.
62. Huang, X., Gaballa, A., Cao, M., and Helmann, J. D. (1999). Identification of target promoters for the Bacillus subtilis extracytoplasmic function sigma factor, sigma W. *Mol Microbiol* 31: 361-371.
63. Kasper, P., Simmonds, P., Schneeweis, KE., Kaiser, R., Matz, B., Oldenburg, J., Brackmann, HH., Holmes, EC. (1995). The genetic diversification of the HIV type 1 gag p17 gene in patients infected from a common source. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 1197-1201.
64. Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 893-905.
65. Katzmann, DJ., Stefan, CJ., Babst, M., Emr, SD. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 162: 413-423.
66. Klein, RD., Sherman, D., Ho, WH., Stone, D., Bennet, GL., Moffat, B., et al., (1997). A GPI-linked protein that interacts with RET to form a candidate neurturin receptor. *Nature* 387: 717-721.
67. Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, MD., Martin, MA., Orenstein, JM. (1990). The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 64: 621-629.

68. Kokubo, H., Helms, J. B., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Horikoshi, Y., and Yamaguchi, H. (2003). Ultrastructural localization of flotillin-1 to cholesterol-rich membrane microdomains, rafts, in rat brain tissue. *Brain Res* **965**: 83-90.
69. Kokubo, H., Lemere, C. A., and Yamaguchi, H. (2000). Localization of flotillins in human brain and their accumulation with the progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurosci Lett* **290**: 93-96.
70. Kusumi, A., Koyama-Honda, I., and Suzuki, K. (2004). Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic* **5**: 213-230.
71. Lafont, F., Verkade, P., Galli, T., Wimmer, C., Louvard, D., Simons, K. (1999). Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Mardin-Darby canine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3734-3738.
72. Lалlos, L. B., Laal, S., Hoxie, J. A., Zolla-Pazner, S., and Bandres, J. C. (1999). Exclusion of HIV coreceptors CXCR4, CCR5, and CCR3 from the HIV envelope. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**: 895-897.
73. Lang, D. M., Lommel, S., Jung, M., Ankerhold, R., Petrausch, B., Laessing, U., Wiechers, M. F., Plattner, H., and Stuermer, C. A. (1998). Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J Neurobiol* **37**: 502-523.
74. Lecatsas, G., Gravell, M., and Sever, J. L. (1984). Morphology of the retroviruses associated with AIDS and SAIDS. *Proc Soc Exp Biol Med* **177**: 495-498.
75. Li, L., and Cohen, S. N. (1996). Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell* **85**: 319-329.
76. Liao, Z., Cimaskasy, LM., Hampton, R., Nguyen, DH., Hildreth, JE. (2001). Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**: 1009-1019.
77. Liao, Z., Graham, D. R., and Hildreth, J. E. (2003). Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**: 675-687.
78. Lindwasser, O. W., and Resh, M. D. (2001). Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* **75**: 7913-7924.
79. Lindwasser, O. W., and Resh, M. D. (2002). Myristoylation as a target for inhibiting HIV assembly: unsaturated fatty acids block viral budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13037-13042.
80. Lingappa, JR., Hill, RL., Wong, ML., Hegde, RS. (1997). A multistep, ATP-dependent pathway for assembly of human immunodeficiency virus capsids in a cell-free system. *J Cell Biol* **136**: 567-581.
81. Liu, J., Deyoung, S. M., Zhang, M., Dold, L. H., and Saltiel, A. R. (2005). The SPFH domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **280**: 16125-16134.
82. Lu, Z., Berson, JF., Chen, Y., Turner, JD., Zhang, T., Sharron, M., Jenks, MH., Wang, Z., Kim, J., Rucker, J., Hoxie, JA., Peiper, SC., Doms, RW. (1997). Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6426-6431.
83. Luban, J. (1996). Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* **87**: 1157-1159.
84. Marin, M., Rose, KM., Kozak, SL., Kabat, D. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **9**:1398-1403.

85. Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P. D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* **7**: 1313-1319.
86. Matthews, T.J., Weinhold, K.J., Lyerly, H.K., Langlois, A.J., Wigzell, H., Bolognesi, D.P. (1987). Interaction between the human T-cell lymphotropic virus type IIIB envelope glycoprotein gp120 and the surface antigen CD4: role of carbohydrate in binding and cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 5424-5428.
87. McCabe, J. B., and Berthiaume, L. G. (1999). Functional roles for fatty acylated amino-terminal domains in subcellular localization. *Mol Biol Cell* **10**: 3771-3786.
88. McManus, M.T., Petersen, C.P., Haines, B.B., Chen, J., Sharp, P.A. (2002). Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* **8**: 842-50.
89. Michel, N., Allespach, I., Venzke, S., Fackler, O. T., and Keppler, O. T. (2005). The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr Biol* **15**: 714-723.
90. Morikawa, Y., Goto, T., Sano, K. (1999). In vitro assembly of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Biol Chem* **274**: 27997-28002.
91. Morrow, I. C., Rea, S., Martin, S., Prior, I. A., Prohaska, R., Hancock, J. F., James, D. E., and Parton, R. G. (2002). Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J Biol Chem* **277**: 48834-48841.
92. Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G., Taraboulos, A. (1997). Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* **272**: 6324-31.
93. Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Luers, G., Stuermer, C. A., Herzog, V., and Tikkanen, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem J* **378**: 509-518.
94. Nguyen, D. H., and Hildreth, J. E. (2000). Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**: 3264-3272.
95. Ono, A., and Freed, E. O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13925-13930.
96. Ott, D. E., Coren, L. V., Johnson, D. G., Kane, B. P., Sowder, R. C., 2nd, Kim, Y. D., Fisher, R. J., Zhou, X. Z., Lu, K. P., and Henderson, L. E. (2000). Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **266**: 42-51.
97. Ott, D. E., Coren, L. V., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Arthur, L. O., and Henderson, L. E. (1995). Analysis and localization of cyclophilin A found in the virions of human immunodeficiency virus type 1 MN strain. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**: 1003-1006.
98. Palmer, E., and Goldsmith, C. S. (1988). Ultrastructure of human retroviruses. *J Electron Microscop Tech* **8**: 3-15.
99. Pan, B.T., Johnstone, R.M. (1983). Fate of transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**: 967-978.
100. Pelchen-Matthews, A., Kramer, B., and Marsh, M. (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* **162**: 443-455.
101. Percherancier, Y., Lagane, B., Planchenault, T., Staropoli, I., Altmeyer, R., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Hoessli, D. C., and Bachelier, F. (2003). HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J Biol Chem* **278**: 3153-3161.



102. Pessin, J.E., Glaser, M. (1980). Budding of Rous sarcoma virus and vesicular stomatitis virus from localized lipid regions in the plasma membrane of chicken embryo fibroblasts. *J Biol Chem* **255**: 9044-9050.
103. Pomorski, T., Hrafnisdottir, S., Deveaux, P.F., van Meer, G. (2001). Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Semin Cell Dev Biol* **12**: 139-48.
104. Popik, W., Alce, T. M., and Au, W. C. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol* **76**: 4709-4722.
105. Popik, W., and Alce, T. M. (2004). CD4 receptor localized to non-raft membrane microdomains supports HIV-1 entry. Identification of a novel raft localization marker in CD4. *J Biol Chem* **279**: 704-712.
106. Pornillos, O., Garrus, J. E., and Sundquist, W. I. (2002). Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol* **12**: 569-579.
107. Pornillos, O., Higginson, D. S., Stray, K. M., Fisher, R. D., Garrus, J. E., Payne, M., He, G. P., Wang, H. E., Morham, S. G., and Sundquist, W. I. (2003). HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol* **162**: 425-434.
108. Prior, I.A., Muncke, C., Parton, R.G., Hancock, J.F. (2003). Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* **160**: 165-170.
109. Rabesandratana, H., Toutant, J.P., Reggio, H., Vidal, M. (1998): Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released with exosomes during in vitro maturation of reticulocytes. *Blood* **91**: 2573-2580.
110. Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C. A., Plattner, H., and Illges, H. (2003). Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8241-8246.
111. Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., and Geuze, H. (2002). Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**: 718-729.
112. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., and Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **183**: 1161-1172.
113. Rappersberger, K., Gartner, S., Schenk, P., Stingl, G., Groh, V., Tschachler, E., Mann, D. L., Wolff, K., Konrad, K., and Popovic, M. (1988). Langerhans' cells are an actual site of HIV-1 replication. *Intervirology* **29**: 185-194.
114. Renkonen, O., Kaarainen, L., Simons, K., Gahmberg, C.G. (1971). The lipid class composition of Semliki forest virus and plasma membranes of the host cells. *Virology* **46**: 318-326.
115. Reuter, A., Binkle, U., Stuermer, C. A., and Plattner, H. (2004). PrPc and reggies/flotillins are contained in and released via lipid-rich vesicles in Jurkat T cells. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2092-2099.
116. Sandefur, S., Varthakavi, V., and Spearman, P. (1998). The I domain is required for efficient plasma membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag. *J Virol* **72**: 2723-2732.
117. Santamaria, A., Castellanos, E., Gomez, V., Benedit, P., Renau-Piqueras, J., Morote, J., Reventos, J., Thomson, T. M., and Paciucci, R. (2005). PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts. *Mol Cell Biol* **25**: 1900-1911.
118. Saphire, A. C., Bobardt, M. D., and Gallay, P. A. (2002). trans-Complementation rescue of cyclophilin A-deficient viruses reveals that the requirement for cyclophilin A in human immunodeficiency virus type 1 replication is independent

- of its isomerase activity. *J Virol* **76**: 2255-2262.
119. Sapin, C., Colard, O., Delmas, O., Tessier, C., Breton, M., Enouf, V., Chwetzoff, S., Ouanich, J., Cohen, J., Wolf, C., and Trugnan, G. (2002). Rafts promote assembly and atypical targeting of a nonenveloped virus, rotavirus, in Caco-2 cells. *J Virol* **76**: 4591-4602.
  120. Sato, Y., Sagami, I., Shimizu, T. (2004). Identification of caveolin-1 interacting sites in neuronal nitric-oxide synthase. Molecular mechanism for inhibition of NO formation. *J Biol Chem* **279**: 8827-8836.
  121. Scarlata, S., and Carter, C. (2003). Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta* **1614**: 62-72.
  122. Schroeder, R., London, E., and Brown, D. (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12130-12134.
  123. Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F., and Stuermer, C. A. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development* **124**: 577-587.
  124. Shearer, MC., Fawcett, JW. (2001). The astrocyte/meningeal cell interface -- a barrier to succesful nerve regeneration? *Cell Tissue Res* **305**: 267-273.
  125. Sherer, N. M., Lehmann, M. J., Jimenez-Soto, L. F., Ingmundson, A., Horner, S. M., Cicchetti, G., Allen, P. G., Pypaert, M., Cunningham, J. M., and Mothes, W. (2003). Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**: 785-801.
  126. Simons, G., van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**: 6197-6202.
  127. Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.
  128. Singer, SJ., Nicolson, GL. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-31.
  129. Smart, EJ., Graf, GA., McNiven, MA., Sessa, WC., Engelman, JA., Scherer, PE., Okamoto, T., Lisanti, MP. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* **19**: 7289-7304.
  130. Solomon, S., Masilamani, M., Rajendran, L., Bastmeyer, M., Stuermer, C. A., and Illges, H. (2002). The lipid raft microdomain-associated protein reggie-1/flotillin-2 is expressed in human B cells and localized at the plasma membrane and centrosome in PBMCs. *Immunobiology* **205**: 108-119.
  131. Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W., Green, WC. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both ist translation and intracellular stability. *Mol Cell* **12**: 591-601.
  132. Stuchell, M. D., Garrus, J. E., Muller, B., Stray, K. M., Ghaffarian, S., McKinnon, R., Krausslich, H. G., Morham, S. G., and Sundquist, W. I. (2004). The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem* **279**: 36059-36071.
  133. Stuermer, C. A., Lang, D. M., Kirsch, F., Wiechers, M., Deininger, S. O., and Plattner, H. (2001). Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol Biol Cell* **12**: 3031-3045.
  134. Stuermer, C. A., Langhorst, M. F., Wiechers, M. F., Legler, D. F., Von Hanwehr, S. H., Guse, A. H., and Plattner, H. (2004). PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *Faseb J* **18**: 1731-1733.

135. Svarovskaia, ES., Xu, H., Mbisa, JL., Barr, R., Gorelick, RJ., Ono, A., Freed, EO., Hu, WS., Pathak, VK. (2004). Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem* **279**:35822-35828.
136. Takahashi, M. (2001). The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**: 361-373
137. Tavernarakis, N., Driscoll, M., and Kyrpides, N. C. (1999). The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 425-427.
138. Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J., and Gottlinger, H. G. (1994). Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**: 363-365.
139. Thomas, JL., Holokawa, D., Baird, B., Webb, WW. (1994). Large-scale co-aggregation of fluorescent lipid probes with cell surface proteins. *J Cell Biol* **125**: 795-802.
140. Towers, G. J., Hatzioannou, T., Cowan, S., Goff, S. P., Luban, J., and Bieniasz, P. D. (2003). Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med* **9**: 1138-1143.
141. Tritel, M., and Resh, M. D. (2000). Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates. *J Virol* **74**: 5845-5855.
142. Trump, BF., Goldblatt, PJ., Stowell, RE. (1965). Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural and cytochemical alterations of cytosomes, cytosegresomes, multivesicular bodies, and microbodies and their relation to the lysosome concept. *Lab Invest* **14**: 1946-1968.
143. Tu, X., Huang, A., Bae, D., Slaughter, N., Whitelegge, J., Crother, T., Bickel, P. E., and Nel, A. (2004). Proteome analysis of lipid rafts in Jurkat cells characterizes a raft subset that is involved in NF-kappaB activation. *J Proteome Res* **3**: 445-454.
144. van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, MT., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, FC., Brummelkamp, TR., Agami, R., Clevers, H. (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* **4**:609-615.
145. van Meer, G. (1989). Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol* **5**: 247-275.
146. VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T. J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J., and Carter, C. A. (2001). Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7724-7729.
147. Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, SJ., Smart, EJ., Anderson, RG., Taraboulos, A., Prusiner, SB. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14945-14949.
148. Vidal, M., Sainte-Marie, J., Philippot, JR., Biennvenue, A. (1989). Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for "aminophospholipid translocase". *J Cell Physiol* **140**: 455-462.
149. Volonte, D., Galbiati, F., Li, S., Nishiyama, K., Okamoto, T., Lisanti, MP. (1999). Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* **274**: 12702-12709.
150. von Philipsborn, A. C., Ferrer-Vaquer, A., Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A., and Malaga-Trillo, E. (2005). Restricted expression of reggie genes and proteins during early zebrafish development. *J Comp Neurol* **482**: 257-272.

151. Wang, J. K., Kiyokawa, E., Verdin, E., and Trono, D. (2000). The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 394-399.
152. Welker, R., Hohenberg, H., Tessmer, U., Huckhagel, C., Krausslich, HG. (2000). Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**: 1168-1177.
153. Xie, W., Li, L., and Cohen, S. N. (1998). Cell cycle-dependent subcellular localization of the TSG101 protein and mitotic and nuclear abnormalities associated with TSG101 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1595-1600.
154. Zacharias, DA., Violin, JD., Newton, AC., Tsien, RY. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**: 855-857.
155. Zhang, H. M., Li, Z., Tsudome, M., Ito, S., Takami, H., and Horikoshi, K. (2005). An alkali-inducible flotillin-like protein from *Bacillus halodurans* C-125. *Protein J* **24**: 125-131.
156. Zheng, Y. H., Plemenitas, A., Fielding, C. J., and Peterlin, B. M. (2003). Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8460-8465.
157. Zimmerman, C., Klein, KC., Kiser, PK., Singh, AR., Firestein, BL., Riba, SC., Lingappa, JR. (2002). Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* **415**: 88-92.

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Name: Beicht  
Vorname: Peter  
Geburtsdatum/-ort: 31.07.1972, Bad Neuenahr / Ahrweiler  
Anschrift: Seehofstrasse 6  
60594 Frankfurt am Main  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1978 - 1982 Grundschule in Antweiler  
1982 - 1991 Erich-Klausner-Gymnasium, Adenau  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst:

1991 - 1993 Ausbildung zum Offizier der Reserve, Rheinbach

### Hochschulbildung:

1993 - 1998 Universität Bonn: Studiengang Biologie  
1998 - 1999 Diplomarbeit an der Universitätsklinik Bonn  
Jun 1999 Diplom  
Jul 1999 - Sep 2000 Mitarbeiter am Institut für Virologie der Universität Köln  
Seit Okt 2000 Promotion bei Frau Prof. Dr. Tikkanen, Oktober 2000 bis April 2003 am Institut für Zellbiologie, seit Mai 2003 am Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum Frankfurt am Main

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Frankfurt am Main, den 21. Juli 2005

Peter Beicht