

Interaktionsanalyse zwischen Flotillin-1 und dem HIV-1 Gag-Protein

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Salihu, Blendi

aus Fulda

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Biochemisches Institut

1. Gutachterin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Glebe

Tag der Disputation: 12.09.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Viruslehre.....	1
1.2 Humane Immundefizienz-Virus (Human Immunodeficiency Virus): HIV	2
1.2.1 Übertragungswege	2
1.2.2 Klinischer Verlauf der HIV-1 Infektion	3
1.2.3 Antiretrovirale Therapie (ART).....	3
1.2.4 Resistenz vor HIV-1 Infektion.....	5
1.2.5 Nebenwirkung der antiretroviralen Therapie.....	6
1.2.6 Laborchemische Messung der Wirksamkeit der ART	6
1.3 Molekularbiologische Eigenschaften des HIV-1.....	6
1.3.1 HIV-1: Struktureller Aufbau.....	6
1.3.2 Genomstruktur vom HIV-1.....	7
1.3.3 Gag-Protein	9
1.3.4 Vermehrungszyklus von HIV-1	12
1.4 Flotilline.....	14
1.4.1 Lipid Rafts	14
1.4.2 Oligomerisierung	14
1.4.3 Struktureller Aufbau der Flotilline.....	15
1.4.4 Funktionen	15
1.5 Ziele der Dissertationsarbeit	17
2. Materialien	18
2.1 Geräte und technische Hilfsmittel	18
2.2 Chemikalien und Reagenzien	19
2.3 Puffer	20
2.4 Polyacrylamid-Gele	22

2.5 Prokaryotische Zellen	23
2.6 Eukaryotische Zelllinien.....	23
2.7 DNA-Konstrukte	23
2.8 Antikörper.....	25
3. Methoden.....	27
3.1 Kultivierung von HeLa- und HEK 293T-Zellen	27
3.2 Transfektion von Plasmiden (Gag-GFP / LTAL-Gag-GFP)	27
3.3 Umklonierung von Flotillin-1-Fragmenten aus Yeast-2-Hybrid-Vektoren in pGEX-4T1	28
3.3.1 Midipräparation – Plasmidaufreinigung	28
3.3.2 Restriktionsverdau der Flotillin-1 Konstrukte und pGEX-4T1	28
3.3.3 Ligation der Flotillin-1-Inserts mit dem Vektor pGEX-4T1	29
3.3.4 Transformation in E.coli-Stamm XL1-Blue	29
3.3.5 Plasmidpräparation von Minikulturen	30
3.3.6 Glycerin-Stocks.....	30
3.4 Induktion der GST-Fusionsproteine	31
3.5 Affinitätsaufreinigung der GST-Fusionsproteine	32
3.6 Interaktionsanalyse durch einen indirekten GST-Pulldown.....	33
3.7 SDS-PAGE	34
3.8 Coomassie-Färbung	34
3.9 Western Blot	35
3.10 Immundetektion.....	35
3.11 Isolierung von Virus-ähnlichen Partikeln (Virus-like Particles, VLP).....	36
4. Ergebnisse	37
4.1 Umklonierung der Flotillin-1-Fragmente aus Yeast-2-Hybrid-Vektoren in pGEX-4T1	37
4.2 Induktion der GST-Fusionsproteine	40
4.3 GST-Affinitätsaufreinigung der Fusionsproteine	42

4.4 GST-Pulldown-Interaktionsanalysen.....	44
4.4.1 Interaktionen zwischen den Flotillin-1 Fragmenten (Flot-1-full length-GST, Reg2-CC-GST, Reg2-STOP328-GST) und dem Gag-GFP-Protein.....	44
4.4.2 Interaktionsanalyse zwischen den Gag-Fragmenten (Gag-full length-GST, MA (p17)-GST, CA (p24)-GST, p6-GST) und dem Flotillin-1	46
4.4.3 Interaktionen zwischen den MA (p17) Fragmenten (MA-full length-GST, MA-NT-GST, MA-CT-GST) und dem Flotillin-1	48
4.5 Bestimmung von Virus-ähnlichen Partikel (Virus-like Particles, VLP)	50
5. Diskussion	53
5.1 Flotillin-1 Fragmente zeigen unterschiedliche Interaktionsintensitäten mit dem Gag-Protein.....	54
5.2 Die zentrale Bedeutung vom MA (p17) in der Interaktion mit dem Flotillin-1	55
5.3 MA-NT und MA-CT zeigen starke Interaktion mit Reggie-2/Flotillin-1	57
5.4 Generierung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLP).....	59
5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick	60
6. Zusammenfassung.....	62
7. Summary	63
8. Literaturverzeichnis.....	64
9. Ehrenwörtliche Erklärung	70
10. Danksagung.....	71

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Viruslehre

Viren verfügen über infektiöse Eigenschaften und besitzen keinen eigenen Stoffwechsel. Damit sie sich vermehren können, bedarf es der Nutzung eines Syntheseapparates, welches von einem selbstständig lebensfähigen Organismus (Wirtszelle) stammt (Löffler 2008). Dabei synthetisiert die Wirtszelle alle notwendigen Strukturen, welche zur Virusvermehrung notwendig sind. Anschließend erfolgt die Virusfreisetzung.

Viren sind Partikel, die ein Genom in Form von DNA oder RNA enthalten. Diese kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein. Manchmal ist das Genom partiell doppelsträngig vorhanden, wie beispielsweise bei den Hepatitis B-Viren, bei anderen liegt das Genom wiederum segmentiert vor (z.b. Orthomyxoviridae) (Hof and Dörries 2009).

Die einzelsträngigen RNA-Moleküle kann man nochmal unterteilen in ss (+) RNA und ss (-) RNA. Die ss (+) RNA besitzt eine Polarität zur mRNA, sodass sie direkt für die virale Proteinbiosynthese verwendet werden kann (Hof and Dörries 2009). ss (-) RNA hingegen verfügt über umgekehrte Polarität zur mRNA. Diese muss daher zunächst in einen positiven Einzelstrang umgeschrieben werden, welcher anschließend für die Translation verwendet werden kann (Hof and Dörries 2009). Nebenbei gibt es auch einige Viren, die beide Polaritäten (Ambisense) auf einem Einzelstrang RNA Molekül aufweisen (Hof and Dörries 2009).

Ein bekanntes Beispiel für ss (+) -RNA Viren stellt das Humane Immundefizienz Virus dar (HIV) (Hof and Dörries 2009). In den folgenden Kapiteln soll näher auf das HI-Virus eingegangen, da es für die vorliegende Arbeit eine große Bedeutung hat.

1.2 Humane Immundefizienz-Virus (Human Immunodeficiency Virus): HIV

Das humane Immundefizienz-Virus gehört zur Gruppe der Lentiviren, welche wiederum zu den Retroviren zählen (Fanales-Belasio *et al.* 2010). Das HIV ist der Erreger von AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), eine Erkrankung, die im Verlauf das Immunsystem des Organismus massiv beschädigt. Es wird zwischen HIV-1 und HIV-2 unterschieden.

HIV-1 wird in drei Gruppen unterteilt, welche M (Major), O (Outlier) und N (non-M/non-O) genannt werden (Fanales-Belasio *et al.* 2010). Des Weiteren lässt sich die Gruppe M in weitere Untergruppen (A-K) unterteilen (Bundesgesundheitsbl. 2004; Fanales-Belasio *et al.* 2010). Während die Untergruppen von M (Major) spezifisch die größte Ausbreitung territorial darstellen, sind die Gruppen O (Outlier) und N (non-M/non-O), vor allem in Gabun, Kamerun und deren Nachbarländern präsent (Fanales-Belasio *et al.* 2010).

HIV-1 ist für die meisten Infektionen auf der Welt verantwortlich, während HIV-2 vor allem in Westafrika vorkommt (Esbjörnsson *et al.* 2019). Des Weiteren soll HIV-1 bezogen auf HIV-2 virulenter bzw. pathogener und somit gefährlicher für den Menschen sein (Whittle *et al.* 1994; Esbjörnsson *et al.* 2019).

1.2.1 Übertragungswege

Das HIV kann über Geschlechtsverkehr, Blutkontakt sowie von Mutter zu Kind übertragen werden (Arastéh *et al.* 2009). Beim Geschlechtsverkehr zeigt sich eine hohe Konzentration an Viruspartikel in der Samenflüssigkeit, sowie im Vaginalsekret (Arastéh *et al.* 2009). Im Blut zeigt sich ebenfalls eine hohe Viruslast, sodass Spritzkanülen bei Drogenabhängigkeit und Bluttransfer von Blutprodukten einen Übertragungsweg darstellen (Arastéh *et al.* 2009). Bei der Übertragung von Mutter zu Kind ist eine Infektion vor der Geburt, während der Geburt sowie nach der Geburt beim Stillen möglich (Hoffman and Rockstroh 2020).

1.2.2 Klinischer Verlauf der HIV-1 Infektion

Der Krankheitsverlauf der HIV-1 Infektion kann in die drei zeitlichen Abschnitte akutes Infektions-, Latenz- und symptomatisches Stadium, eingeteilt werden (Arastéh *et al.* 2009).

Im akuten Infektionsgeschehen steigt die Viruslast rapide an, während die CD4⁺-Zellen absinken (Arastéh *et al.* 2009). Häufig macht sich dies klinisch bemerkbar durch eine fieberhafte Symptomatik mit Gliederschmerzen, Lymphadenopathie und Exanthem (Arastéh *et al.* 2009). Nach mehreren Wochen der akuten Infektion sinkt die Viruslast wieder ab, und die CD4⁺-Zellen erholen sich.

Im asymptomatischen Stadium (Latenzstadium) steigt die Viruslast erneut über mehrere Jahre kontinuierlich an, während die CD4⁺-Zellen stetig fallen (Arastéh *et al.* 2009). In dieser Zeit zeigen die infizierten Menschen keine Symptome. Nach mehreren Jahren stetig steigender Viruslast und zunehmend sinkender CD4⁺-Zellzahl treten schließlich die ersten Symptome, wie beispielsweise Mundsoor auf (Arastéh *et al.* 2009).

Bei einer CD4⁺-Zellzahl von <200/μl treten AIDS typische Erkrankungen auf, welche unter anderem opportunistische Infektionskrankheiten, maligne sowie neuronale Erkrankungen darstellen (Arastéh *et al.* 2009).

1.2.3 Antiretrovirale Therapie (ART)

Eine vollständige HIV-Eradikation ist bis heute nicht möglich. Dennoch stehen einige Möglichkeiten zur Verfügung, um die Erkrankung so zu therapieren, dass eine normale Lebensführung möglich ist. Zurzeit stehen fünf Wirkstoffgruppen zur Verfügung (Tab.1), welche im klinischen Alltag zur Anwendung kommen (Hoffmann and Rockstroh 2020). Für den Therapiebeginn wird eine Dreifach-Therapie mit zwei NRTIs (Nukleosidische/Nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren) und einer dritten Wirkstoffgruppe, entweder NNRTI (Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren), geboosterter PI (Proteaseinhibitor) oder Integraseinhibitor empfohlen (Hoffmann and Rockstroh 2020).

Nukleosidische/Nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)

NRTIs sind Pro-Drugs. Bevor sie in der menschlichen Zelle ihre antivirale Wirkung entfalten können, bedarf es einer dreifachen Phosphorylierung, welche in der Zelle stattfindet (Hoffmann and Rockstroh 2020). NRTIs sind strukturell veränderte Nukleosid-/Nukleotidanaloga und entfalten ihre Wirkung an der Reversen Transkriptase. Der Einbau von NRTIs bei der reversen Transkription führt zum Abbruch der DNA-Synthese (Arastéh *et al.* 2009; Hoffmann and Rockstroh 2020).

Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)

NNRTIs entfalten ihre Wirkung an der Reversen Transkriptase, indem sie nicht-kompetitiv an das virale Enzym binden. Durch die Bindung kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Enzyms, welches die katalytische Aktivität herabsetzt. Somit wird die Virusvermehrung verlangsamt (Arastéh *et al.* 2009; Hoffmann and Rockstroh 2020).

Integraseinhibitoren

Der Einbau der viralen DNA in das chromosomale Erbmateriale der Wirtszelle wird durch Integraseinhibitoren gehemmt (Arastéh *et al.* 2009). Hierdurch wird der Prozess der Virusgenerierung reduziert.

Proteaseinhibitoren (PI)

PIs hemmen die Aktivität der viralen Protease, sodass die Vorläuferproteine, welche beim viralen Replikationszyklus entstehen, nicht gespalten werden können. Hierdurch kann eine Reifung der Viren nicht stattfinden, und es entstehen nicht-infektiöse Viren (Arastéh *et al.* 2009; Hoffmann and Rockstroh 2020).

Eintrittsinhibitoren

Attachment-Inhibitoren

Attachment-Inhibitoren hemmen die Assoziation zwischen dem viralen gp120 Oberflächenprotein und dem CD4-Rezeptor der Wirtszelle. Zwei Wirkstoffgruppen werden hier unterschieden: Während die eine Wirkstoffgruppe am gp120-Protein ihre Wirkung entfaltet, ist die andere Wirkstoffgruppe am CD4-Rezeptor wirksam (Hoffman and Rockstroh 2020).

Fusionsinhibitoren

Fusionsinhibitoren blockieren das virale gp41 Transmembranprotein, sodass eine Fusion der viralen Membran mit der Wirtsmembran nicht zustande kommt (Arastéh *et al.* 2009).

Co-Rezeptor-Inhibitoren

HIV-1 benutzt für den Eintritt in die Wirtszelle neben dem CD4-Rezeptor auch die Co-Rezeptoren CXCR4 und CCR5. Zurzeit ist Maraviroc der einzige CCR5-Rezeptor Antagonist, welcher zur Therapie zugelassen wurde (Hoffman and Rockstroh 2020).

Tabelle 1: Zusammenfassende Darstellung der antiretroviralen Therapie (ART)

Wirkstoffgruppen	Wirkmechanismus
NRTI	Abbruch der reversen Transkription durch Nukleosid-/Nukleotidanaloga
NNRTI	Herabsetzung der katalytischen Aktivität der Reversen Transkriptase
Integraseinhibitoren	Hemmung der Integration des viralen Genoms in das chromosomale Erbgut der Wirtszelle
Proteaseinhibitoren	Hemmung der viralen Protease
<u>Eintrittsinhibitoren:</u> Attachment-Inhibitoren Fusionsinhibitoren Co-Rezeptor Inhibitoren	Inhibieren den Eintritt der Viruspartikel in den CD4-positiven Zellen

1.2.4 Resistenz vor HIV-1 Infektion

Eine kurative Therapie gegen das HIV-1 ist bislang nicht möglich. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Personen mit einem homozygoten Gendefekt auf dem Gen *CCR5* (Deletion von 32 Basenpaare im *CCR5*-Gen) nahezu resistent gegen Infektionen mit R5-Viren sind (Liu *et al.* 1996). Dies zeigt die große Bedeutung des Co-Rezeptors für den Infektionsprozess des HIV-1.

1.2.5 Nebenwirkung der antiretroviralen Therapie

Je nachdem, welche Kombinationstherapie durchgeführt wird, kann es zu unterschiedlichen Nebenwirkungen kommen. Diese können von leichten gastrointestinalen Beschwerden wie Übelkeit oder Diarrhoen bis hin zu schweren Organstörungen wie Anämien, Rhabdomyolysen oder Nierenversagen reichen (Arastéh *et al.* 2009; Hoffmann and Rockstroh 2020). Bei schweren Nebenwirkungen sollte die Therapie gegebenenfalls umgestellt werden.

1.2.6 Laborchemische Messung der Wirksamkeit der ART

Für die Beurteilung der antiretroviralen Therapie werden vor allem die Viruslast (HIV-RNA Kopienanzahl/ml) und die CD4⁺-Zellen herangezogen (Arastéh *et al.* 2009; Hoffmann and Rockstroh 2020). Eine erfolgreiche Therapie zeichnet sich durch eine sinkende Viruslast unter der Nachweisgrenze (<50 RNA-Kopien/ml), sowie eine steigende CD4⁺-Zellzahl aus (Hoffman and Rockstroh 2020).

1.3 Molekularbiologische Eigenschaften des HIV-1

1.3.1 HIV-1: Struktureller Aufbau

Die infektiösen HIV-1-Partikeln besitzen eine Membran mit einer Lipiddoppelschicht und sind ungefähr 100 nm groß (Hoffmann and Rockstroh 2020). In dieser Lipidmembran sind virale Proteine integriert, welche zuvor in der Wirtszelle synthetisiert wurden.

Diese viralen Membranproteine bestehen aus zwei Einheiten, dem gp120 Oberflächenprotein und dem gp41 Transmembranprotein. Beide Einheiten stehen in nicht-kovalenter Verbindung miteinander und bilden auf nächst höherer Organisationsebene Trimere aus (Fanales-Belasio *et al.* 2010; Hoffmann and Rockstroh 2020).

Unterhalb der Lipidmembran befinden sich die Matrixproteine (p17), sowie das weiter im inneren liegende Kapsid. Das Kapsid wiederum besteht aus den Kapsidproteinen CA (p24) und umhüllt das virale Genom, das Nucleoprotein (p7), die Integrase, die Protease und die Reverse Transkriptase (Bundesgesundheitsbl. 2004; Hoffmann and Rockstroh 2020).

1.3.2 Genomstruktur vom HIV-1

Das Genom der HI-Viren besteht aus zwei einzelnen RNA Strängen. Die Genstrukturen von HIV-1 und HIV-2 sind sehr ähnlich zueinander. Während das Gen *vpu* beim HIV-2 Virus fehlt, ist es stattdessen beim HIV-1 vorhanden. Dagegen enthält das HIV-2 Genom das *vpx*-Gen, das beim HIV-1 fehlt (Levy 1993; Korber *et al.* 1997; Weiss 2000).

Sowohl an der 5`- als auch an der 3`-Region beinhaltet das Genom LTR (long terminal repeat) Sequenzen. Diese fungieren als regulatorische Bereiche für die Genexpression und sind auch an der Polyadenylierung mitbeteiligt. Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Integration von viralem Genom in chromosomaler Wirts-DNA (Korber *et al.* 1997; Hoffmann and Rockstroh 2020).

HIV-1 beinhalten die Gene *gag* (*group-specific-antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*) (Korber *et al.* 1997; Weiss 2000). Das *gag*-Gen kodiert für die Strukturproteine MA (p17), CA (p24), NC (p7) und p6. Die Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase werden dagegen von der *pol*-Region kodiert (Korber *et al.* 1997; Weiss 2000; Fanales-Belasio *et al.* 2010). Die Oberflächenproteine gp120 und gp41 werden zunächst zu einem Vorläuferprotein gp160 von der *env*-Region synthetisiert, bevor die Protease das Vorläuferprotein spaltet (Earl *et al.* 1991; Korber *et al.* 1997). Neben *gag*, *pol* und *env* gibt es noch eine Vielzahl anderer Gene (Abb.1) welche die Replikation, Transkription und Translation des viralen Genoms maßgeblich regulieren und beeinflussen.

Das tat-Protein interagiert mit dem TAR der LTR-Region und fördert die virale Genexpression (Levy 1993; Korber *et al.* 1997). *Rev* hingegen ist dafür zuständig, dass die virale RNA nach der Transkription aus dem Zellkern in das Zytoplasma eingeschleust werden kann (Weiss 2000; Fanales-Belasio *et al.* 2010). Das Gen *Vif* soll dafür sorgen, dass die Viren infektiöser werden (Levy 1993; Weiss 2000), während *vpr* bei der Beförderung der viralen DNA in den Nukleus der Wirtszelle behilflich ist (Hoffman and Rockstroh 2020). *Vpu* dagegen nimmt eine wichtige Rolle bei der Virusfreisetzung ein (Levy 1993; Korber *et al.* 1997; Weiss 2000; Fanales-Belasio *et al.* 2010), und *Nef* reguliert unter anderem Oberflächenproteine wie die CD4-Rezeptoren auf den infizierten Wirtszellen herunter (Korber *et al.* 1997; Weiss 2000; Fanales-Belasio *et al.* 2010).

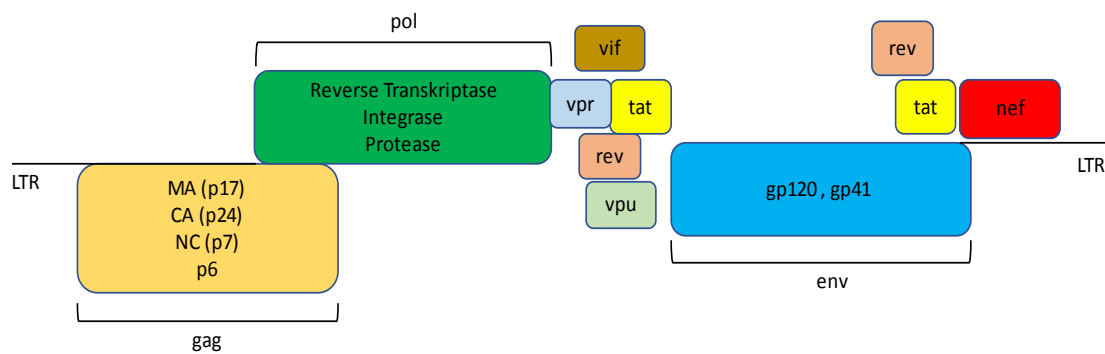


Abbildung 1: Genomstruktur vom HIV-1.

An beiden Enden des Genoms befinden sich die regulatorisch fungierenden LTR-Regionen. Dazwischen liegen *gag*, *pol*, *env* und eine Vielzahl an regulatorischen Genen. Während *vpu* dem HIV-2 fehlt, fehlt dem HIV-1 das *vpx*-Gen.

1.3.3 Gag-Protein

Das Gag-Protein ist für den Zusammenbau („*assembly*“) und die Freisetzung („*budding*“) der infektiösen Viruspartikel verantwortlich (Scarlatà and Carter 2003; Ganser-Pornillos *et al.* 2012; Freed 2015). Das 55 kDa große Vorläuferprotein Gag (Spearman 2016) ist in der Lage, Virus-ähnliche Partikel (*Virus like Particle*) auch ohne andere virale Elemente zu generieren und freizusetzen (Freed 1998; Scarlatà and Carter 2003; Spearman 2016). Das Gag-Protein besteht aus dem MA (p17), CA(p24), NC (p7), p6 und den beiden Spacer-Peptiden SP1 und SP2 (Scarlatà and Carter 2003; Spearman 2016) (Abb.2).

Das Gag-Protein wird von dem *gag*-Gen kodiert. Nach der Transkription wird die ungespleißte mRNA an den freien Ribosomen translatiert (Spearman 2016). Nach der Fertigstellung des Gag-Protein erfolgt anschließend der Transport zur Plasmamembran der Wirtszelle, wo die einzelnen Strukturelemente des Virus zusammenbaut und die fertig hergestellten Viruspartikel freisetzt werden (Scarlatà and Carter 2003).

MA (p17):

Das MA (p17) Protein besteht aus mehreren helikalen Strukturen, welche sich zusammenlagern (Hill *et al.* 1996). Am N-terminalen Ende befindet sich die Myristinsäure, sowie basische Aminosäuresequenzen, welche eine zentrale Rolle beim Zusammenbau spielen. Sowohl die Myristinsäure, als auch die basischen Sequenzen sind für die Assoziation von MA (p17) mit den Phosphatidylinositol(4,5) bisphosphaten (PI(4,5)P₂) der Lipiddoppelmembran notwendig. (Zhou *et al.* 1994; Hill *et al.* 1996; Chukkapalli *et al.* 2008).

CA (p24):

Das CA (p24, Capsid) Protein kann in zwei Domänen, dem CA-NT auf der N-terminalen Seite und dem CA-CT auf der C-terminalen Seite untergliedert werden (Scarlatà and Carter 2003). Es hat sich gezeigt, dass für die Oligomerisierung der Gag-Proteine bei der Assemblierung die C-terminale Region des CA (p24) besonders relevant ist (Accola *et al.* 1998). Nach der Virusreifung stellt das CA (p24) die Kapsidhülle da.

NC (p7):

Aus dem Vorläuferprotein Pr55^{gag} wird an der C-Terminalen Seite zunächst das NCp15 geschnitten. Anschließend erfolgt die Spaltung in die beiden Domänen NC(p7) und p6 (Morellet *et al.* 1992). Das kleine Protein NC (p7) verfügt über zwei Zinkfinger motive und ist an mehreren Prozessen bei der Assemblierung beteiligt (Morellet *et al.* 1992). Mithilfe der Zinkfinger ist das Protein in der Lage, virale genomische RNA in die Kapsidhülle zu bewegen (Morellet *et al.* 1992; Rocquigny *et al.* 1992). So wird sichergestellt, dass das virale Genom in den neu hergestellten Viruspartikeln enthalten ist. Des Weiteren ist das NC (p7) in der Lage, die tRNA(Lys3), welche als Primer für die reverse Transkription fungiert, an die virale genomische RNA zu binden (Morellet *et al.* 1992; Rocquigny *et al.* 1992).

p6: („budding“)

Das p6- Protein befindet sich am C-terminalen Ende vom Pr55^{gag} und ist für die Freisetzung („budding“) der neugebildeten Viruspartikel verantwortlich. Für die Ausknospung machen sich die Viruspartikel die ESCRT (*Endosomal sorting complexes required for transport*)-Komplexe (0-I-II-III) und weitere Proteine, wie Alix, VP4 und NEDD4-Enzyme der Wirtszelle zu Nutze (Waheed and Freed 2012; Ganser-Pornillos *et al.* 2012).

Die natürlichen Aufgaben der ESCRT-Komplexe bestehen unter anderem in der Bildung von multivesikulären Körpern (MVB), bei welcher Ubiquitin-markierte Frachtproteine in Endosomen durch Vesikel abgeschnürt werden, die im weiteren Verlauf durch Lysosomen abgebaut werden (Hurley 2008). Des Weiteren zeigte sich, dass die ESCRT-Komplexe an der Zellteilung mitbeteiligt sind (Morita *et al.* 2007).

Das p6 Protein vom HIV-1 enthält mehrere späte Domänen („late domains“), die bestimmte Sequenzen aufweisen, welche für die Virusfreisetzung unentbehrlich sind. Eine der Domänen ist die PTAP-Sequenz mit der Aminosäurenabfolge Prolin-Threonin-Alanin-Prolin (Freed 2002). Eine weitere Domäne ist die YPXL (Tyrosin-Prolin-X_n-Leucin, X=beliebige Aminosäure). Des Weiteren befindet sich noch die PPXY (Prolin-Prolin-X-Tyrosin) Domäne auf p6, welche in der Lage ist, Proteine der NEDD4-Gruppe zu rekrutieren (Ganser-Pornillos *et al.* 2012).

Beim Vorgang der Virusfreisetzung bindet die PTAP-Sequenz an Tsg101, einem Protein, das zum ESCRT-Komplex I gehört, während die YP(X)_nL-Sequenz mit Alix interagiert. Alix wiederum ist in der Lage, mit dem Komplex ESCRT-I und ESCRT-III zu interagieren (VerPlank *et al.* 2001; Ku *et al.* 2014; Freed 2015). Durch die Initiierung der ESCRT-Maschinerie kommt es, vor allem durch ESCRT-III und den VPSE4-Enzymen, zur Freisetzung der Viruspartikeln (Ganser-Pornillos *et al.* 2012).

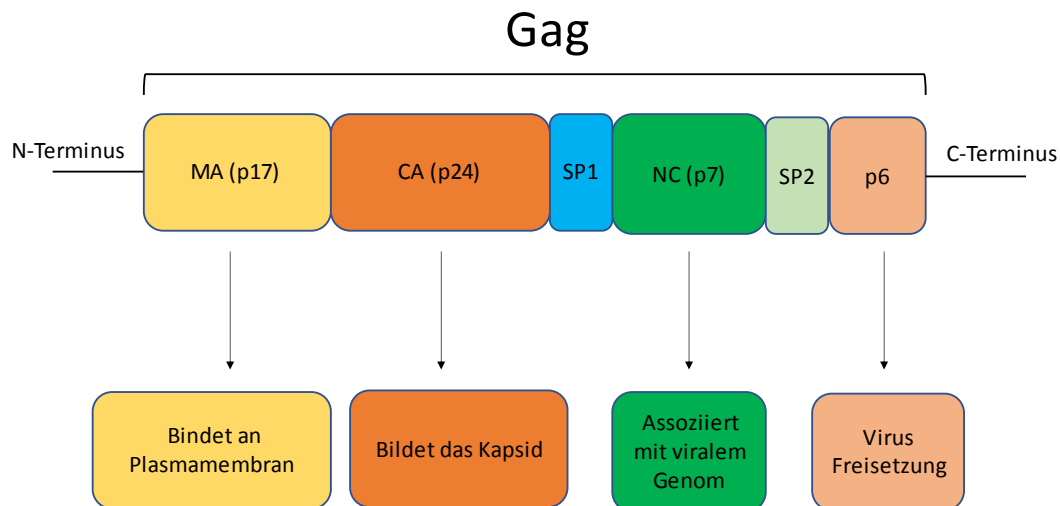


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Gag-Proteins.

Das Gag-Protein ist 55 kDa groß und besteht aus den einzelnen Bausteinen MA (p17), CA (p24), NC(p7), p6 und den beiden Spacer-Peptiden SP1 und SP2. Auf der N-terminalen Seite des MA (p17) befindet sich die Myristinsäure, sowie basische Aminosäuresequenzen, die für die Assoziation mit der Plasmamembran wichtig sind.

1.3.4 Vermehrungszyklus von HIV-1

Immunrezeptoren

HIV-Partikel infizieren Zellen des Immunsystems, die das CD4-Molekül auf ihrer Zelloberfläche tragen. Das 58 kDa große Molekül CD4 befindet sich auf T-Lymphozyten, Makrophagen/Monozyten, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des Zentralen Nervensystems (Fanales-Belasio *et al.* 2010) und besitzt für die Immunantwort eine zentrale Bedeutung. Die CD4-positiven T-Helferzellen interagieren mit MHC II Molekülen, welche sich auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen befinden (Rassow *et al.* 2008) und initiieren damit weitere immunologische Schritte, die maßgeblich zur Bekämpfung von Fremdan antigenen dienen.

Neben dem CD4-Molekül bedarf es weiterer Co-Rezeptoren, damit die Wirtszelle infiziert werden kann. Die Chemokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4 sind beim Infektionsgeschehen ebenfalls mitbeteiligt (Berger *et al.* 1999). CCR5 befindet sich auf T-Gedächtniszellen, aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen/Monozyten und dendritischen Zellen, während CXCR4 unter anderem bei T-Lymphozyten vorkommt (Fanales-Belasio *et al.* 2010; Hoffmann and Rockstroh 2020). Das HIV-1 orientiert sich bei der Infektion nach dem Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche der Wirtszellen (Tropismus). Während die Viren, die CCR5 positive Zellen befallen, R5-Viren genannt werden, werden die Viren, die CXCR4 positive Zellen befallen, als X4-Viren bezeichnet (Fanales-Belasio *et al.* 2010; Hoffmann and Rockstroh 2020). Zusätzlich kommen auch Viren vor, die in der Lage sind, sowohl CCR5-positive-, als auch CXCR4-positive Zellen zu befallen, was als dualer Tropismus bezeichnet wird (Fanales-Belasio *et al.* 2010; Hoffmann and Rockstroh 2020).

HIV-1 Infektion, Genomintegration sowie Partikelfreisetzung aus der Wirtszelle

HIV-1 benutzt für die Infektion die Membranproteine gp120 und gp41. Das gp120 Protein bindet an den CD4- und Chemokin-Korezeptor (CCR5 oder CXCR4). Unter der Einwirkung von gp41 kommt es anschließend zur Verschmelzung der Zellmembranen von Wirtszelle und HIV-1 (Waheed and Freed 2012).

Nachdem die beiden Lipidmembranen miteinander verschmolzen sind, wird das Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle befördert. Anschließend erfolgt die Freisetzung des Inhaltes aus dem Kapsid (Hoffmann and Rockstroh 2020). Die Reverse Transkriptase schreibt die virale genomische RNA in doppelsträngige DNA um. Das Enzym arbeitet dabei jedoch sehr fehlerhaft, sodass es häufig zu Mutationen kommt. Dabei können sehr unterschiedliche Spezies innerhalb eines Organismus entstehen, welche sich der Immunantwort entziehen können (Hoffmann and Rockstroh 2020).

Die virale doppelsträngige DNA wird nach der reversen Transkription zusammen mit der Integrase in den Zellkern befördert und anschließend mithilfe des Enzyms Integrase in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Das so entstandene Provirus kann nun für die Genexpression verwendet werden (Bundesgesundheitsbl. 2004; Hoffmann and Rockstroh 2020).

Nach der Expression der strukturellen, oberflächlichen, enzymatischen und regulatorischen Proteine, sowie der viralen genomischen RNA erfolgt der Zusammenbau und die Freisetzung der Viruspartikel an den *Lipid rafts* (Abschnitt 1.4.1) der Wirtszellmembran (Nguyen and Hildreth 2000; Suzuki and Suzuki 2006; Waheed and Freed 2009). Während bzw. nach der Ausknospung finden noch einige Reifungsschritte, wie die Spaltung des Gag-Vorläuferproteins durch die virale Protease, statt (Freed 2015).

1.4 Flotilline

Im Jahre 1997 ist zum ersten Mal beschrieben worden, dass bei der Regeneration eines beschädigten Sehnervs von Goldfischen es zu einer übermäßigen Expression von zwei Proteinen kam, die vorher nicht bekannt waren. Da man die Proteine mit der Regeneration des Sehnervs in Verbindung brachte, bezeichnete man die zwei entdeckten Proteine als Reggie-1 und Reggie-2 (Schulte *et al.* 1997). Im selben Jahr machte eine andere Forschungsgruppe die Entdeckung von zwei Proteinen, welche man Flotillin-1 und Flotillin-2 nannte (Bickel *et al.* 1997). Im Nachhinein stellte sich heraus, dass Flotillin-1 dem Reggie2 und Flotillin-2 dem Reggie-1 Protein entsprachen.

1.4.1 Lipid Rafts

Flotilline sind Proteine, die ubiquitär exprimiert werden und mit Mikrodomänen, den sogenannten *Lipid rafts* assoziieren (Neuman-Giesen *et al.* 2004). *Lipid rafts* (Mikrodomänen) sind dynamische und geordnete Strukturen, welche innerhalb der Membranen vorkommen (Simons and Sampaio 2011). Diese Mikrodomänen sind reich an Cholesterin sowie Sphingolipiden (Pike 2004; Simons and Sampaio 2011) und unter anderem an Prozesse der Signaltransduktion, Endozytose und der Virusreplikation beteiligt (Pike 2004; Suzuki and Suzuki 2006).

1.4.2 Oligomerisierung

Flotilline sind in der Lage, sowohl Homo-, als auch Heterooligomere innerhalb der Zelle zu bilden. Diese oligomeren Strukturen sind an endozytotischen Prozessen, sowie an der Interaktion mit *Lipid rafts* beteiligt (Frick *et al.* 2007; Neuman-Giesen *et al.* 2004). Des Weiteren hat sich gezeigt, dass die Oligomerisierung zur Stabilität der Flotilline beiträgt, da gezeigt werden konnte, dass es in der Abwesenheit von Flotillin-2 zu einem Verlust von Flotillin-1 kommt (Solis *et al.* 2007).

1.4.3 Struktureller Aufbau der Flotilline

Die Grundstruktur von Flotillin-1 und Flotillin-2 besteht aus zwei Domänen, der PHB (Prohibitin-Homologie)- bzw. SPHF (Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HfIK/C)- Domäne auf der N-terminalen Seite und der Flotillin-Domäne an der C-terminalen Region (Marrow *et al.* 2002; Morrow and Parton 2005).

Die PHB- bzw. SPHF-Domäne spielt eine wichtige Rolle an der Interaktion zwischen den Flotillinen und den Lipid rafts. Damit es zu einer Interaktion kommen kann, müssen zunächst Acylierungen von Aminosäuren durchgeführt werden. An Flotillin-1 wird Cystein 34 palmyliert (Marrow *et al.* 2002). Bei Flotillin-2 muss zunächst Glycin2 myristyliert werden, bevor die Cysteine 4, 19 und 20 palmyliert werden können. Ohne diese Lipidmodifikationen ist eine Assoziation mit der Lipidmembran nicht gegeben (Neumann-Giesen *et al.* 2004).

Die Flotillin-Domäne ist durch α -Helices gekennzeichnet, die in der Lage sind, *coiled-coil*-Strukturen auszubilden. Dieser Abschnitt scheint eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Oligomeren einzunehmen und ist auch an der Assoziation mit den *Lipid rafts* beteiligt (Bickel *et al.* 1997; Neuman-Giesen *et al.* 2004; Solis *et al.* 2007).

1.4.4 Funktionen

Man weiß heute, dass Flotilline an vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen mitwirken, jedoch sind ihre Aufgaben nicht vollständig geklärt (Neumann-Giesen *et al.* 2004). Sie sind unter anderem an Endozytoseprozessen, Sortierung von Proteinen, Zelladhäsionen, neuronalen Erkrankungen oder beim Tumorgeschehen mitbeteiligt (Jakobowitz and Kallarakal 2004; Neumann-Giesen *et al.* 2007; Riento *et al.* 2009; Kurrle *et al.* 2013; Phuyal *et al.* 2014; Meister *et al.* 2017; Gauthier-Rouvière *et al.* 2020). Im Folgenden wird auf die Prozesse der Endozytose, sowie Transport und Sortierung von Proteinen näher eingegangen.

Flotilline scheinen eine wichtige Rolle bei endozytotischen Vorgängen einzunehmen. So hat sich herausgestellt, dass Flotillin-1 an der Internalisierung von Cholera-Toxin B-Untereinheit und dem GPI-(Glycosylphosphatidylinositol) verankerten Protein CD59 beteiligt ist (Glebov *et al.* 2006). Eine Herunterregulierung von Flotillin-1 mit siRNA zeigte

eine Reduktion der endozytotischen Prozesse von Cholera-Toxin B-Untereinheit und des GPI-gebundenen Proteins CD59 (Glebov *et al.* 2006).

Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass die Src-Kinasen bei den endozytotischen Vorgängen der Flotilline eine regulatorische Funktion ausüben (Neumann-Giesen *et al.* 2007; Riento *et al.* 2009). Die Fyn-Kinase ist in der Lage, Flotillin-1 an Tyrosin 160 und Flotillin-2 an Tyrosin 163 zu phosphorylieren (Riento *et al.* 2009). Mutationen an diesen Regionen haben gezeigt, dass die Flotillin-abhängige Endozytose des GPI-verknüpften Protein CD59 reduziert ist (Riento *et al.* 2009).

Neben der Mitwirkung an endozytotischen Vorgängen spielen Flotilline unter anderem eine wichtige Rolle beim intrazellulären Verkehr von Proteinen. So hat sich gezeigt, dass Flotilline beim Transport des Shiga-Toxins (Bakterielles Gift) und Ricin (Pflanzliches Toxin) eine wichtige Rolle einnehmen (Pust *et al.* 2010). Des Weiteren hat sich gezeigt, dass Flotillin-1 an der Sortierung von ubiquitinierten Frachtproteinen, sowie an der Wechselwirkung zwischen den Komplexen ESCRT-0 und ESCRT-I in den Endosomen beteiligt ist (Meister *et al.* 2017).

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Flotilline an der Regulation der endozytotischen Recycling-Prozesse des T-Zell-Rezeptors über Rab-Proteine in Endosomen mitbeteiligt sind (Redpath *et al.* 2019). So konnte man aufzeigen, dass Flotilline sowohl bei der Aufnahme in Rab5-positive Endosomen, als auch beim Transport des T-Zell-Rezeptors von Rab5- zu Rab11a-positive Endosomen eine zentrale Rolle einnehmen (Redpath *et al.* 2019).

Flotilline werden neben den Endosomen auch mit Exosomen in Verbindung gebracht. Exosomen sind vesikuläre Strukturen, die durch Verschmelzung von Multivesikulären Körpern mit der Zellmembran entstehen. Dabei werden die intrazellulären Vesikel in den extrazellulären Raum abgegeben (Phuyal *et al.* 2014). Flotilline scheinen hierbei an der Sortierung von Proteinen in Exosomen beteiligt zu sein. So konnte man zeigen, dass eine Herunterregulierung der Flotilline mittels siRNA die Zusammensetzung der Proteine in Exosomen beeinflusste, während jedoch die Menge der Gesamtfreisetzung an Exosomen nicht signifikant verändert wurde (Phuyal *et al.* 2014).

1.5 Ziele der Dissertationsarbeit

Aus früheren Arbeiten der AG Tikkanen ist bekannt, dass zwischen dem Flotillin-1 und dem HIV-1 Gag-Protein Interaktionen bestehen. Bei dieser Arbeit sollten die Interaktionen zwischen den beiden Proteinen mithilfe von GST-Pulldown-Experimenten genauer analysiert werden.

Für die Interaktionsanalyse wurden hierfür einzelne Flotillin-1- und Gag-Fragmente verwendet, um das Reaktionsgeschehen weiter eingrenzen bzw. besser beurteilen zu können. Anschließend wurde der MA (p17)-Teil des Gag-Protein näher untersucht.

Neben der Fähigkeit, in Wechselwirkung mit Flotillin-1 zu treten, ist das Gag-Protein in der Lage, ohne weitere virale Elemente nicht infektiöse Virus-ähnliche Partikel (VLPs) zu erzeugen. Wie sich schon aus anderen Arbeiten herausgestellt hat, spielt Flotillin-1 eine wichtige Rolle bei der Generierung der VLPs. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Flotillin-1 und der p6-Domäne von Gag bei der VLP-Generierung durch einen Flotillin-1-Knockout und einer Mutation der PTAP-Sequenz zur LTAL-Sequenz weiter untersucht werden.

2. Materialien

2.1 Geräte und technische Hilfsmittel

Dargestellt sind die Geräte und technischen Hilfsmittel, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2: Die benutzten Geräte und technischen Hilfsmittel mit Angabe des Herstellers.

Geräte	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	NeoLab, Heidelberg (DE)
Bakterien-Schüttler - KS-15	Edmund-Bühler, Bodelshausen (DE)
Entwicklermaschine - Curix 60	AGFA, Düsseldorf (DE)
Hamiltonspritze	Unimetics Coporation, Los Angeles (USA)
Inkubator für Bakterien	MMM, Darmstadt (DE)
Küvetten	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht (DE)
Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel (DE)
Röntgenfilme	Fujifilm, Düsseldorf (DE)
neolab-Rotator	NeoLab, Heidelberg (DE)
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Spektralphotometer - BioPhotometer plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)
Heizblock	Laborgeräte München, München (DE)
Ultraschall-Homogenisator - Sonopuls	Bandelin, Berlin (DE)
Vortex Bio Vortex V1	PEQLAB, Erlangen (DE)
Wester Blot - Criterion Blotter	Bio Rad Laboratories, München (DE)
Zentrifugen	
Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen (DE)
Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen (DE)
J2-21	Beckmann, Krefeld (DE)

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Dargestellt sind die Chemikalien und Reagenzien, welche für die Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 3: Die benutzten Chemikalien und Reagenzien mit den Herstellern.

Name	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Ammoniumpersulfat (APS)	Applichem, Darmstadt (DE)
Aprotinin	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Bovine Serum Albumine (BSA)	PAA, Cölbe (DE)
Coomassie Brilliant Blau G250	AppliChem, Darmstadt (DE)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Dulbecco`s modified Eagle medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Enhanced chemiluminescence (ECL)	GE Healthcare, München (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Filmentwickler	Calbe Chemie, Stadtfeld (DE)
Fetal calf serum (FCS)	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Glutathion Sepharose Beads	GE Healthcare, München (DE)
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim (DE)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Lysozym	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe (DE)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Machery-Nagel, Düren (DE)
Octyl-β-D-glucopyranosid (NOG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Plasmid DNA purification NucleoBond Xtra Midi	Machery-Nagel, Düren (DE)
Plasmid DNA purification NucleoSpin Plasmid (NoLid)	Machery-Nagel, Düren (DE)
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt (DE)
Proteinstandardmarker	BioRad, München (DE)
Serumreduziertes Medium (Optimem)	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Triton-X-100	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)

2.3 Puffer

Nachfolgend sind die Pufferlösungen aufgelistet, die verwendet wurden.

Tabelle 4: Pufferlösungen und deren Inhaltsstoffe.

Pufferlösung	Inhaltsstoffe
Blocklösung	TBST 5% Milchpulver
Blotpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris, 10% Methanol
Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung	0,1% Coomassie Brilliant Blau 42,5% Ethanol, 5% Methanol, 10% Essigsäure

Coomassie-Brilliant-Blau-Entfärbung	7,5% Essigsäure 20% Methanol
Enhanced chemiluminescence -Lösung (ECL)	200 µM p-Cumarinsäure 100 mM Tris-HCl pH:8,5 1250 µM Luminol Vor der Verwendung hinzugegeben: 10% H ₂ O ₂ (1:1000)
GST-Lyse-Puffer	50 mM Hepes pH:7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 5% Glycerin 0,1% NP-40 Vor der Verwendung hinzugegeben: 1,5 µM Aprotinin (1:1000) 23 µM Leupeptin (1:1000) 1,5 µM Pepstatin A (1:1000) 1 mM PMSF (1:100) 1 mM DTT (1:1000)
Ko-Immunpräzipitationspuffer (Co-IP-Puffer)	10 mM Tris pH:8,0 0,15 M NaCl 5 mM EDTA 1% Triton X100
4x Ladepuffer für Proteine	250 mM Tris-HCl pH:6,8 8% SDS, 0,4% Bromphenolblau, 40% Glycerin, 100 mM DTT
Lämmli-Puffer	0,1% SDS 25 mM Tris 192 mM Glycin
LB-Medium	1000 ml H ₂ O 25 g LB
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	150 mM NaCl, pH:7,4 20 mM NaH ₂ PO ₄

Ponceau-Lösung	0,1% Ponceau S 5% Essigsäure
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH:7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40
Tris buffered saline with Tween 20 (TBST)	10 mM Tris - HCl pH:7,4 150 mM NaCl 0,05% Tween 20

2.4 Polyacrylamid-Gele

Tabelle 5: Nachfolgend ist die Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele aufgelistet, welche für die vorliegende Arbeit verwendet wurden.

Trenngel 10%	21 ml H ₂ O 5 ml 3M Tris pH:8,8 200 µl SDS 20% 13,4 ml Acrylamid 10% 64 µl TEMED 400 µl APS 10%
Sammelgel 4%	11,7 ml H ₂ O 624 µl 3M Tris pH:6,8 75 µl SDS 20% 2,55 ml Acrylamid 4% 22,5 µl TEMED 75 µl APS 10%

2.5 Prokaryotische Zellen

Tabelle 6: Nachfolgend sind die Bakterienstämme aufgelistet, die verwendet wurden.

Bezeichnung	XL-1 Blue	Rosetta (DE3) pLysS
Bakterienstamm	E.coli	E.coli
Verwendungszweck	DNA-Amplifikation	Expression rekombinanter Proteine
Hersteller	Stratagene, La Jolla, California (USA)	Merck, Darmstadt (DE)

2.6 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 7: Aufgelistet sind die eukaryotischen Zelllinien, die verwendet wurden.

Bezeichnung	Information
HeLa-Zellen	Humane epitheliale Zervixkarzinomzellen.
Flotillin-1-Knockout-HeLa-Zellen (F1-KOa)	HeLa Zellen, dessen Flotillin1-Gen ausgeschaltet wurde.
HEK 293T-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen (HEK). 293T-Zellen sind eine Sonderform der HEK-Zellen. Sie exprimieren zusätzlich das SV40 large T-Antigen.

2.7 DNA-Konstrukte

Tabelle 8: Flotillin-1-Fragmente aus Yeast-2-Hybrid-Vektoren, die für die Umklonierung verwendet wurden.

Konstrukt	Reg2-CC-pGBKT7	Reg2-STOP328-pGAD
Aminosäuren	328-428	1-327
Antibiotikum-Resistenz	Kanamycin	Ampicillin
Hersteller	AG Tikkanen	AG Tikkanen

Tabelle 9: DNA-Konstrukte, welche für die Proteinexpression verwendet wurden.

Konstrukt	Insert	Vektor	Hersteller
Flot-1-full length-pGEX-4T1	Flotillin-1-full length	pGEX-4T1	AG Tikkanen
Reg2-CC-pGEX-4T1	Reg2-CC (328-428)	pGEX-4T1	Diese Arbeit
Reg2-STOP328-pGEX-4T1	Reg2-STOP328 (1-327)	pGEX-4T1	Diese Arbeit
Gag-full length-pGEX-4T1	Gag-full length	pGEX-4T1	AG Tikkanen
MA-pGEX-4T1	MA (p17)	pGEX-4T1	AG Tikkanen
CA-pGEX-4T1	CA (p24)	pGEX-4T1	AG Tikkanen
p6-pGEX-4T1	p6	pGEX-4T1	AG Tikkanen
MA-NT-pGEX-4T1	MA-NT	pGEX-4T1	AG Tikkanen
MA-CT-pGEX-4T1	MA-CT	pGEX-4T1	AG Tikkanen

MA-NT: Aminosäuren 1-80 des Gag-Polypeptides

atgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgatgggaaaaaattcgg
M G A R A S V L S G G E L D R W E K I R
ttaaggccaggggaaagaagaagtacaagctaaagcacatcgtatgggcaagcaggggag
L R P G G K K K Y K L K H I V W A S R E
ctagaacgattcgcagtttaattcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaata
L E R F A V N P G L L E T S E G C R Q I
ctgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaggagcttcgatcactatacaac
L G Q L Q P S L Q T G S E E L R S L Y N

MA-CT: Aminosäuren 61-148 des Gag-Polypeptides

ctgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaggagcttcgatcactatacaac
L G Q L Q P S L Q T G S E E L R S L Y N
acagtagcaaccctctattgtgtgcaccagcggatcgagatcaaggacaccaaggaagct
T V A T L Y C V H Q R I E I K D T K E A
ttagacaagatagaggaagagcaaaacaagtccaagaagaaggcccagcagggcagcagct
L D K I E E E Q N K S K K K A Q Q A A A
gacacaggacacagcaatcaggtcagccaaaattaccctatagtgacagaacatccagggg
D T G H S N Q V S Q N Y P I V Q N I Q G
caaatggtacatcaggccatatca
Q M V H Q A I S

Abbildung 3: DNA- und Aminosäuresequenzen der MA(p17)-Fragmente.

Mit **rot** markiert ist der Überlappungsbereich zwischen den Aminosäuren 61-80.

Vektor pGEX-4T1

Der Vektor pGEX-4T1 ist 4,9 kb groß und enthält neben dem Ampicillin Resistenz Gen sowohl ein lac-operon, als auch einen GST-Tag (Glutathion-S-Transferase). Eine an dem GST-Tag gekoppelte MCS (multiple cloning site) Struktur enthält mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme, wodurch es möglich wird, ein beliebiges Gen in das Plasmid einzubauen und so an den GST-Tag zu koppeln. Hierdurch wird gewährleistet, dass nach der Proteinexpression, welche durch das lac-operon reguliert wird, die rekombinanten Proteine durch andere Methoden isoliert werden können.

Tabelle 10: DNA-Konstrukte, die für die Transfektion benutzt wurden.

Bezeichnung	Informationen
Gag-GFP	p6-Domäne enthält PTAP-Sequenz (Prolin-Threonin-Alanin-Prolin).
LTAL-Gag-GFP	In der PTAP-Sequenz wurde Prolin gegen Leucin ausgetauscht, sodass die LTAL-Sequenz entsteht (Leucin-Threonin-Alanin-Leucin).

2.8 Antikörper

Aufgelistet sind die primären und sekundären Antikörper mit Angaben zum Wirt, deren Verdünnung im Western Blot und Hersteller, die verwendet wurden.

Tabelle 11: Primäre Antikörper.

Antikörper	Wirt	Western Blot	Hersteller
anti-Flotillin-1	Maus	1:1000	BD Transduction, Heidelberg (DE)
anti-GFP	Maus	1:1000	Roche, Mannheim (DE)
anti-GAPDH	Maus	1:10000 bis 1:50000	Abcam, Cambridge (UK)

Tabelle 12: Sekundärer Antikörper

Sekundäre Anti-körper	Wirt	Western Blot	Hersteller
anti-Maus-HRP	Ziege	1:10000	Dako, Hamburg (DE)

3. Methoden

3.1 Kultivierung von HeLa- und HEK 293T-Zellen

Die für diese Arbeit verwendeten HeLa- und HEK 293T-Zellen wurden bei 8% CO₂ Gehalt mit DMEM (*Dulbecco`s modified Eagle medium*), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% FCS (*fetal calf serum*) bei 37°C kultiviert.

Nachdem die Zellen eine nahezu 100-prozentige Konfluenz erreicht hatten, erfolgte anschließend die Auftrennung. Hierfür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit der Protease Trypsin versetzt. Das Enzym ist in der Lage, zum einen die Zellen voneinander zu trennen und zu anderen die Zelladhäsionen von den Zellkulturflaschen zu lösen. Nachdem die Zellen separiert und in einem frisch hergestellten Kulturmedium resuspendiert wurden, erfolgte zum einen die direkte Weiterverwendung für anstehende Versuche und zum anderen die erneute Aussäung als Erhaltungskulturen für spätere Experimente.

3.2 Transfektion von Plasmiden (Gag-GFP / LTAL-Gag-GFP)

Jeweils 1 µg DNA, 100 µl serumreduziertes Medium (Optimem) und 4 µl Lipofectamine 2000 wurden pro Well miteinander versetzt. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 60-80% auf den 12 Well-Platten, wurde in den HeLa- bzw. HEK 293T-Zellen zunächst das alte Medium entsorgt. Anschließend wurde ein neu angesetztes Kulturmedium mit den oben genannten DNA-Ansätzen auf die in den Well-Platten befindlichen Zellen überführt. Danach erfolgte die Inkubation bei 37°C über Nacht im Inkubator.

3.3 Umklonierung von Flotillin-1-Fragmenten aus Yeast-2-Hybrid-Vektoren in pGEX-4T1

3.3.1 Midipräparation – Plasmidaufreinigung

Für die Midipräparation wurden zunächst E.coli Stämme aus Glycerin Stocks, welche die Yeast-2-Hybrid-Vektoren enthielten, auf LB-Platten ausgestrichen.

Anschließend wurden mehrere Einzelkolonien in jeweils 5 ml LB-Medium mit zugehörigem Antibiotikum inokuliert. Danach wurden die 5 ml Minikulturen über Nacht bei 37°C im Bakterieneschüttler bei 225 rpm bewegt. Am darauffolgenden Tag wurden jeweils 1 ml der Minikulturen mit je 120 ml LB-Medium und dazugehörigen Antibiotikum versetzt. Die so entstandenen großen Kulturen wurden erneut über Nacht unter denselben Bedingungen wie zuvor in den Bakterieneschüttler gestellt. Nachdem man anschließend die Bakteriendichte der großen Kulturen photometrisch bestimmt hat, erfolgte die Zentrifugation. Während der Überstand verworfen wurde, wurden die Pellets mit *Plasmid DNA purification-NucleoBond Xtra Midi* präpariert. Zum Schluss erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration mithilfe eines Spektralphotometers.

3.3.2 Restriktionsverdau der Flotillin-1 Konstrukte und pGEX-4T1

In der Tabelle 13 ist die Zusammensetzung der Verdauungsansätze mit den Restriktionsenzymen aufgelistet, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 13: Restriktionsverdau der Plasmide.

	Reg2-CC-pGBKT7	Reg2-STOP328-pGAD	pGEX-4T1	pGEX-4T1
DNA (ca.10 µg)	2,5µl	30µl	18µl	18µl
CutSmart-Puffer	2,5µl	6µl	5µl	5µl
EcoRI	1µl	2µl	1µl	1µl
SalI	1µl		1µl	
XhoI		2µl		1µl
H ₂ O	18µl	20µl	25µl	25µl

Verdaut wurde über Nacht bei 37°C im Inkubator. Am nächsten Tag wurden die Verdauungsansätze der Flotillin-1-Konstrukte auf 1% Agarosegel aufgetragen.

Mithilfe der Gelelektrophorese wurden die unterschiedlich großen DNA-Fragmente durch ein elektrisches Feld anhand ihrer Größe aufgetrennt. Der Farbstoff Ethidiumbromid, welcher dem Agarosegel beigemischt wurde, interagiert mit der DNA, sodass unter UV-Licht Einwirkung die einzelnen DNA-Fragmente sichtbar werden. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Inserts aus dem Gel rausgeschnitten und mit *NucleoSpin Gel and PCR Clean up Kit* aufgereinigt.

Bei den Verdauungsansätzen des Vektors pGEX-4T1 wurden hingegen jeweils 4 µl des Ansatzes auf 1% Agarosegel zur Kontrolle aufgetragen. Danach erfolgte die Präparation mit *High Pure PCR Product Purification Kit* direkt aus dem Reaktionsgefäß.

3.3.3 Ligation der Flotillin-1-Inserts mit dem Vektor pGEX-4T1

Die Ligation der Inserts mit dem Vektor pGEX-4T1 fand über Nacht bei 16°C statt.

Tabelle 14: Ligation der Flotillin-1-Inserts in pGEX-4T1.

	Reg2-CC-pGEX-4T1	Reg2-STOP328-pGEX-4T1
Vektor: pGEX-4T1	3 µl	3 µl
Insert	5 µl	5 µl
10xLigasepuffer	1 µl	1 µl
Ligase	1 µl	1 µl

3.3.4 Transformation in E.coli-Stamm XL1-Blue

Für die Transformation wurde der E.coli-Stamm XL1-Blue verwendet. Zunächst wurden 100 µl chemisch kompetente E.coli mit je 5-10 µl Ligationsprodukt versetzt und anschließend für 15-30 min auf Eis gelegt. Nach dem Abkühlen wurden die Ansätze mit einem Hitzeschock bei 45°C für 90 Sekunden behandelt, bevor sie erneut, diesmal für 1-2 min, auf Eis gelegt wurden. Anschließend wurden, nach Zugabe von jeweils 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum, die Ansätze für 45 min bei 37°C im Bakterienschüttler geschüttelt. Danach erfolgte die Zentrifugation mit 5000 UpM. Während der Überstand anschließend

verworfen wurde, wurden die Pellets in LB Medium resuspendiert. Die transformierten Bakterien konnten nun auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

3.3.5 Plasmidpräparation von Minikulturen

Mehrere einzelne Kolonien wurden von den oben genannten AMPI (Ampicillin)-Platten in je 5 ml LB-AMPI inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Danach wurde die DNA der Minikulturen nach folgendem Schema aufgereinigt: Jeweils 2 ml der Bakteriensuspension wurden für 5 Minuten bei 10000-12000 rpm zentrifugiert. Nachdem sich das Pellet abgesetzt hatte, wurde der Überstand abgekippt und es wurden erneut 2 ml derselbigen Suspension zum abgesetzten Pellet hinzugegeben. Nachdem die Suspension erneut zentrifugiert wurde, erfolgte nach dem Abkippen des Überstandes die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den Pellets mit *Plasmid DNA purification-NucleoSpin Plasmid (NoLid)*-Kit (Macherey Nagel). Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Nach der Plasmidpräparation der Minikulturen wurden die neuen Plasmid-Konstrukte (Insert in pGEX-4T1) erneut mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und anschließend auf 1% Agarosegel aufgetragen.

Nachdem der Einbau der Inserts nachgewiesen wurde, erfolgte eine Sequenzierung der Plasmide zum Nachweis der korrekten Sequenz der Inserts im Vektor pGEX-4T1. Anschließend wurden erneut 5 ml Minikulturen aus der ursprünglichen Minikultur (siehe oben) angesetzt.

3.3.6 Glycerin-Stocks

Für die Glycerin-Stocks wurden jeweils 800 µl neu angesetzte Mini-Kultur zu 200 µl Glycerin beigemischt. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen eingefroren.

3.4 Induktion der GST-Fusionsproteine

Nach der Umklonierung der Flotillin-1 Fragmente in den Vektor pGEX-4T1, erfolgte die Transformation der Plasmide in E.coli-Stamm Rosetta, da sich dieser besonders gut für die Proteinexpression eignet. Die Expression der Fusionsproteine induzierte man mithilfe des IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid), welches als Induktor am lac-Operon wirkte. Hierdurch war es möglich, die gewünschten GST-Fusionsproteine zu exprimieren. Am ersten Tag wurden einzelne E.coli-Kolonien, welche die GST gekoppelten Proteine enthielten, mit je 5 ml LB-AMPI versetzt und bei 37°C über Nacht mit 225 rpm im Inkubator geschüttelt.

Am nächsten Tag wurde eine kleine Menge der frisch hergestellten Minikulturen zu neuem LB-AMPI-Medium in einem Verhältnis von 1:100 hinzugegeben und anschließend unter denselben Bedingungen wie zuvor inkubiert. Danach wurde in stündlichen und halbstündlichen zeitlichen Abständen die OD₆₀₀ gemessen, wobei die Induktion beim OD₆₀₀-Wert von 0,4 – 0,6 erfolgte. Vor der Induktion entnahm man 1 ml der Bakterien-suspension, damit man den Unterschied der Proteinexpression vor und nach der Induktion besser beurteilen konnte.

Nach der Zugabe von 0,15 mM IPTG wurde die Bakteriensuspension für die Proteinexpression bei RT über Nacht mit 225 rpm im Inkubator geschüttelt, bevor am nächsten Tag erneut 1ml der Suspension entnommen wurden. Die restliche Bakteriensuspension wurde bei 4°C für 5-10 min mit 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend entsorgt und das Pellet über Nacht eingefroren.

Beurteilung der Proteinexpression:

Die vor und nach der Induktion entnommenen Proben wurden zunächst bei 14000 g zentrifugiert. Während der Überstand verworfen wurde, wurden die Pellets in 100 μ l 2x LB resuspendiert und bei 94°C gekocht. Anschließend wurden die Fusionsproteine auf die SDS-PAGE aufgetragen, aufgetrennt und mit der Coomassie-Färbung angefärbt, sodass der Unterschied der Proteinexpression visuell dargestellt werden konnte.

3.5 Affinitätsaufreinigung der GST-Fusionsproteine

Für den bevorstehenden GST-Pulldown-Versuch mussten die Fusionsproteine isoliert werden, damit man eindeutige Aussagen bei der Interaktionsanalyse treffen kann. Die exprimierten Fusionsproteine sind an dem GST (Glutathion-S-Transferase) -Tag gekoppelt, welches in der Lage ist, an Glutathion zu binden. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Affinitätschromatographie zu Nutze.

Durch die Zugabe von Glutathion-Sepharose-Beads können die Fusionsproteine aufgrund der Bindung zwischen dem GST-Tag und dem Glutathion der Sepharose-Beads isoliert werden. Hierdurch wird es möglich, die zu untersuchenden Proteine für die anstehende Interaktionsanalyse zu gewinnen.

Ablauf:

Während zunächst die Bakterienpellets mit dem GST Lysis-Puffer (enthält Proteinaseinhibitoren) versetzt wurden, erfolgte im Anschluss eine Behandlung mit Ultraschallwellen zweimal für jeweils 1 min. Anschließend wurde Lysozym im Verhältnis von 1:150 hinzugegeben. Damit das Lysozym lang genug wirken konnte, rotierten die Gefäße bei RT für 15 min. Danach wurden die Lösungen für 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend einmal für 1 min mit Ultraschall beschallt. Nachdem Ultraschall erfolgte die Zentrifugation bei 4°C für eine halbe Stunde.

Während der halbstündigen Zentrifugation wurden die Glutathion-Sepharose-Beads bearbeitet:

Für 50 ml ursprüngliche Bakteriensuspension wurden 50 µl Glutathion-Sepharose-Beads benötigt. Danach wurden die Beads mit dd H₂O, PBS und GST-Lysis-Puffer jeweils einmal gewaschen. Zwischendurch erfolgte die Zentrifugation für 2 min mit 2000 rpm bei 4°C. Während der Überstand entsorgt wurde, wurden die Beads in dem GST-Lyse-Puffer (enthält zusätzlich Proteinaseinhibitoren) resuspendiert.

Nach der oben erwähnten halbstündigen Zentrifugation der Bakterienlysate wurde der Überstand (=Lysat) zu den gewaschenen Glutathion-Sepharose-Beads hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben für die Interaktion über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad fest fixiert.

Nachdem die Beads an die Fusionsproteine gebunden hatten, wurden die Lösungen bei 4°C für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Während der Überstand verworfen wurde, erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS+0,1% Triton X-100 und danach mit PBS ohne Zusatz. Anschließend wurden die Beads in PBS+10% Glycerin resuspendiert.

Um die Menge an isolierten Fusionsproteinen bestimmen zu können, wurden die Proben mit definierten Mengen an BSA als Vergleich auf die SDS-PAGE aufgetragen und anschließend mit der Coomassie-Lösung angefärbt.

3.6 Interaktionsanalyse durch einen indirekten GST-Pulldown

Herstellung von Zelllysaten:

HeLa- und HEK 293T-Zellen wurden mit CO-IP Puffer, welches zusätzlich 60mM N-Octylglucosid und Proteaseinhibitoren enthielt, versetzt. Nachdem die Lysate anschließend für eine halbe Stunde auf Eis gelegt wurden, erfolgte die Zentrifugation. Während die Überstände für die Interaktion aufgehoben wurden, wurden die Pellets entsorgt.

Behandlung der Zelllysate mit Pansorbin:

300 µl Pansorbin wurden zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Nachdem zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl Lysepuffer resuspendiert. Die Zelllysate wurden anschließend zweimal mit je 150 µl Pansorbin-Lysepuffer-Gemisch inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen.

Indirekter GST-Pulldown:

Die mit Pansorbin behandelten Zelllysate wurden mit 10% BSA, GST-Beads (mit gebundenen Fusionsproteinen) und Lysepuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für ca. 3 h bei 4°C auf das Drehrad gestellt. Nach der Inkubation wurden die Beads zunächst für einige Minuten zentrifugiert und anschließend fünfmal mit jeweils 1 ml CO-IP Puffer gewaschen. Zwischendurch wurde erneut zentrifugiert, wobei der Überstand mit einer Hamilton-Spritze komplett aspiriert wurde. Während die Beads anschließend mit 2xLB versetzt wurden, wurde der Kontrollprobe Lysat 4xLB beigemischt.

3.7 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist ein Verfahren, bei der Proteine in einem elektrischen Feld anhand ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden. Das SDS, welches den Gelen beigemischt wurde, ist ein anionisches Detergenz, das mit den Proteinen interagiert. Zum einen denaturiert das SDS beim Kochen die Proteine auf ihre Primärstruktur, zum anderen verleiht es den Proteinen eine negative Ladung. Da alle Proteine durch die Interaktion mit dem SDS negativ geladen sind, erfolgt beim Anlegen des elektrischen Feldes die Auftrennung in Richtung Anode.

Für die folgende Arbeit wurden Sammelgele mit 4% Acrylamid und Trenngele mit 10% Acrylamid verwendet. Den Probenansätzen wurde Proteinladepuffer beigemischt bevor sie für 4 min bei 94°C im Heizblock gekocht wurden. Nachdem die Ansätze gekocht und auf das Gel aufgetragen wurden, erfolgte die Auftrennung für mindestens eine Stunde. Während im Sammelgel die Stromstärke auf 15 mA/Gel eingestellt war, wurde beim Trenngel auf 20 mA/Gel hochgestellt.

3.8 Coomassie-Färbung

Nachdem die Proteine auf dem Polyacrylamid-Gel in der SDS PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte die Sichtbarmachung der Proteine mithilfe der Coomassie-Färbung. Dazu wurde das Polyacrylamid-Gel für ca. 30 Minuten in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Proteine interagieren mit dem Coomassie Brilliant Blau und werden auf diese Weise farblich (blau) dargestellt. Nach der Färbung erfolgte die Entfärbung durch die Coomassie-Entfärbelösung, um die restliche, nicht gebundene Farbe zu entfernen.

3.9 Western Blot

Der Western-Blot ist ein Verfahren, bei dem Proteine aus den Polyacrylamidgelen auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Mithilfe eines elektrischen Feldes werden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Vor dem Transfer wurde das Polyacrylamidgel zusammen mit einer Nitrozellulosemembran in eine Apparatur eingebracht, wobei sowohl in der vorderen als auch in der hinteren Fläche zusätzlich ein Filterpapier und ein Schwamm eingelegt wurden. Anschließend wurde bei 400 mA für mindestens eine Stunde geblottet.

Zur Prüfung, ob die Proteine an der Membran hafteten, erfolgte nach dem Transfer die Inkubation der Membran für einige Minuten in Ponceau S. Die restliche, nicht gebundene Farbe wurde mit destilliertem Wasser abgewaschen. Bei erfolgreichem Transfer wurden die Proteine auf der Membran farblich (rot) dargestellt. Nach der Sichtbarmachung der Proteine wurde die Färbung mit TBST abgewaschen.

3.10 Immundetektion

Grundsätzlich beruht der Mechanismus der Immundetektion auf zwei Schritten. Im ersten Schritt wird ein primärer Antikörper mit dem zu untersuchenden Protein versetzt. Im nächsten Schritt gibt man einen sekundären Antikörper, welcher mit einem Enzym markiert ist, hinzu. Dieser ist nun in der Lage, an den primären Antikörper zu binden. Bei Zugabe des entsprechenden Substrates ist das Enzym in der Lage, ein Produkt zur visuellen Darstellung zu bilden, womit der indirekte Nachweis des zu untersuchenden Proteins erfolgt.

Um eine spezifische Immundetektion zu gewährleisten, mussten zunächst die freien Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran geblockt werden. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran zunächst für 30 min in einer 5% Milchpulverlösung in TBST inkubiert und anschließend mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C versetzt. Danach erfolgte der dreimalige Waschvorgang mit TBST für jeweils 10 min. Nachdem anschließend der sekundäre Antikörper für 1 h bei RT hinzugegeben wurde, erfolgte erneut das dreimalige Waschen mit TBST wie zuvor beschrieben.

Um die Interaktion mit dem zu untersuchenden Protein sichtbar machen zu können, erfolgte nun die Inkubation der Membran mit einem Gemisch aus 1 µl 10% H₂O₂ und 1 ml

ECL-Lösung für 2 min. Die Meerrettichperoxidase, die an dem sekundären Antikörper gebunden ist, katalysiert die Emission von Licht (Lumineszenz), welches visuell dargestellt werden kann. Nach der Inkubation wurde die Membran getrocknet und danach zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Kassette fest eingebracht. Anschließend erfolgte die Belichtung des Röntgenfilms zwischen einigen Sekunden und mehreren Minuten.

3.11 Isolierung von Virus-ähnlichen Partikeln (Virus-like Particles, VLP)

Für die Isolierung der VLPs wurden HeLa- und Flotillin-1 Knockout HeLa -Zellen (F1-KOa) verwendet. Nachdem man die VLPs für 48 h gesammelt hat, wurden die Zellen im Medium abgeschabt und anschließend für 3-5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Medium von den Zellpellets getrennt.

Medium: Jeweils 2 ml Medium wurden durch einen Filter (0,2 µm) filtriert. Anschließend wurde 1 ml filtriertes Medium zu 400 µl Saccharose-Puffer (20% Saccharose in PBS) darauf pipettiert, ohne jedoch die zwei Phasen zu mischen. Danach wurde für 90 min mit 20000 xg bei 4°C zentrifugiert. Nachdem man den Überstand abpipettiert hat, wurden die Pellets mit den VLPs in 90 µl Lysepuffer lysiert und für 20 min auf Eis gelegt. Nach der Prozedur wurden 35 µl des Ansatzes mit 4xLadepuffer versetzt und anschließend für 4 min bei 94°C erhitzt.

Zellpellets: In einem Gemisch aus 2 ml Lysepuffer und 10 µl Proteaseinhibitoren wurden die Zellpellets lysiert und anschließend für 30 min auf Eis gelegt. Zwischendurch wurde kräftig gemischt. Nach der 30-minütigen Lyse auf Eis und der anschließenden Zentrifugation bei 4°C für 12 min mit 15000 rpm, wurden jeweils 30 µl des Überstandes zu je 10 µl 4xLadepuffer hinzugegeben und für 4 min bei 94°C erhitzt.

Jeweils 30 µl der oben genannten Ansätze (Lysat, VLP) wurden auf SDS-PAGE Gele aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend für 1,5-2 h geblottet.

4. Ergebnisse

4.1 Umklonierung der Flotillin-1-Fragmente aus Yeast-2-Hybrid-Vektoren in pGEX-4T1

In den vorherigen Arbeiten der AG Tikkanen konnte bereits gezeigt werden, dass Flotillin-1 mit dem Gag-Protein interagiert (Beicht 2005; Koskimies 2013; Meister *et al.* 2017). Um bei dieser Arbeit eine präzise Aussage treffen zu können, welcher Abschnitt des Flotillin-1 mit dem Gag-Protein in einem GST-Pulldown-Experiment interagiert, mussten hierfür zwei Flotillin-1 Fragmente gewählt werden, die gemeinsam das gesamte Flotillin-1 Protein darstellen.

Daher wurden für die Umklonierung die Flotillin-1-Fragmente Reg2-CC in pGBKT7 und Reg2-STOP328 in pGAD, welche von der AG Tikkanen stammen, verwendet. Während Reg2-CC die C-terminale Region mit dem Aminosäurenabschnitt 328-428 von Flotillin-1 darstellt, enthält Reg2-STOP328 den N-terminalen Abschnitt mit den Aminosäuren 1-327. Als Zielvektor der Umklonierung wurde pGEX-4T1 etabliert, da aufgrund des GST-Tag die Isolierung der rekombinanten Fusionsproteine mithilfe der späteren Affinitätschromatographie ermöglicht wurde. Die so gewonnenen GST Fusionsproteine konnten anschließend für die Interaktionsanalyse mit dem Gag-Protein in einem GST-Pulldown Versuch verwendet werden.

Um die Interaktionen zwischen den Flot-1-Fragmenten und dem Gag-Protein zu ermöglichen, erfolgte daher zunächst die Umklonierung nach folgendem Schema:

Die beiden Flotillin-1 Fragmente in den Yeast-2-Hybrid-Vektoren und der Vektor pGEX-4T1 wurden zunächst mit Restriktionsenzymen verdaut. Während für Reg2-CC-pGBKT7 die Restriktionsenzyme EcoRI und Sal I verwendet wurden, erfolgte bei Reg2-STOP328-pGAD die Anwendung von EcoRI und Xho. Dementsprechend wurde auch der Vektor pGEX-4T1 mit zwei Restriktionsenzymen (EcoRI+Sal I bzw. EcoRI+Xho) behandelt. Nachdem Restriktionsverdau wurden die Ansätze auf 1% Agarosegel aufgetragen, um die Inserts darzustellen (Abb.4).

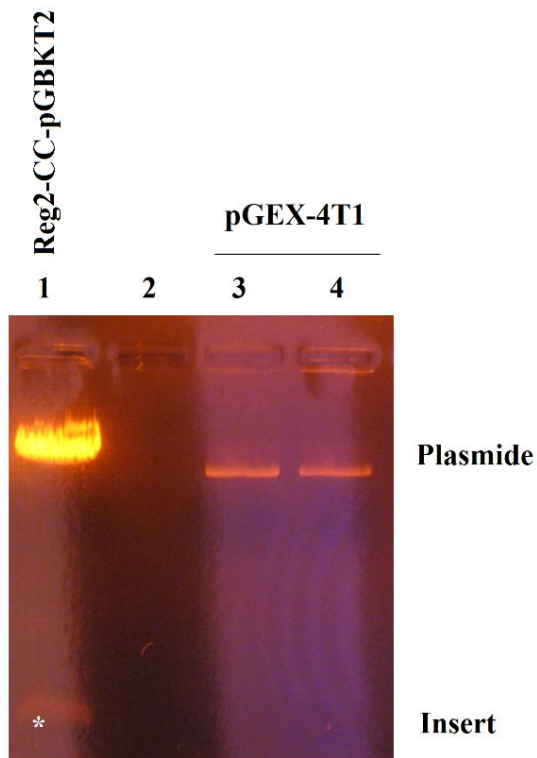
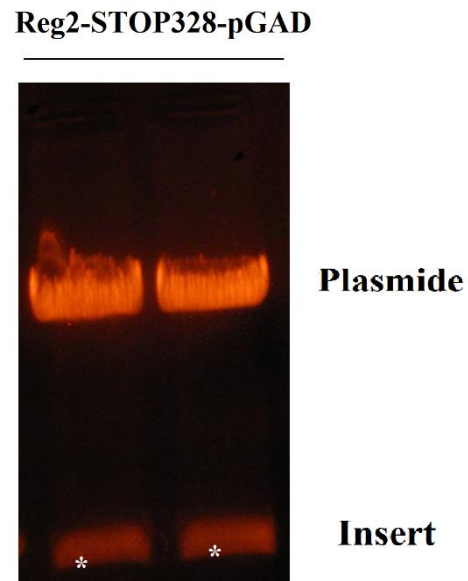
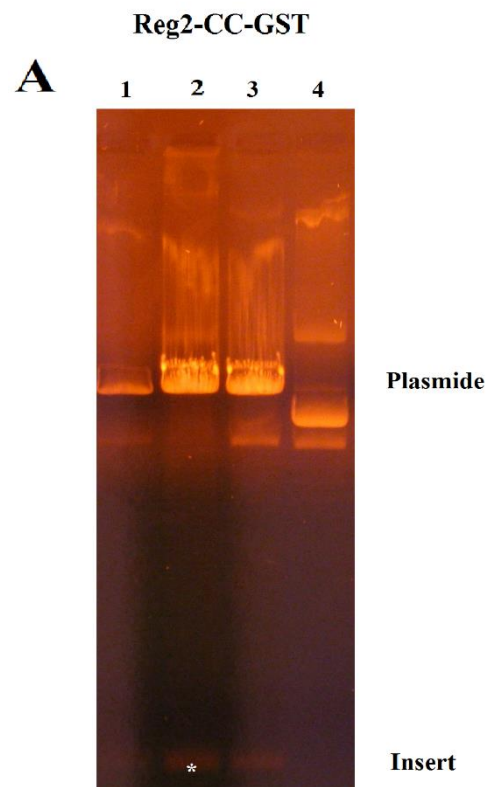
A**B**

Abbildung 4: Restriktionsverdau von pGex-4T1 und den Flotillin-1-Fragmenten aus Yeast-2-Hybrid-Vektoren auf 1% Agarosegel.

A+B: Die mit * markierten Banden stellen die gewünschten Inserts der Yeast-2-Hybrid-Vektoren dar.
A: In der Tasche 1 wurde der Verdau von Reg2-CC-pGBKT7 aufgetragen. In der Tasche 3 ist der Verdau von pGEX-4T1 (EcoRI+Sal I) aufgetragen. In der Tasche 4 wurde der Verdauansatz pGEX-4T1 (EcoRI+Xho) aufgetragen. Die Tasche 2 wurde nicht befüllt. **B:** In den beiden Taschen wurde der Verdauungsansatz von Reg2-STOP328-pGAD aufgetragen.

Nachdem man die Verdauungsansätze auf 1% Agarosegel aufgetragen hatte, erfolgte die Plasmid-DNA Aufreinigung der Inserts aus dem Gel. Die geschnittenen pGEX-4T1 Vektoren hingegen, wurden direkt mit *High Pure PCR Product Purification Kit* aufgereinigt. Nach der DNA Aufreinigung wurden die Inserts mit dem geschnittenen Vektor pGEX-4T1 mithilfe der DNA-Ligase ligiert und anschließend in E.coli-Stamm XL-1-Blue transformiert.

Nach der Plasmidamplifikation in XL-1-Blue wurde die DNA aus Einzelkolonien erneut präpariert, verdaut und anschließend auf 1% Agarosegel zur Kontrolle aufgetragen (Abb.5). Um zu überprüfen, ob die Inserts im Vektor pGEX-4T1 korrekt eingebaut wurden, erfolgte eine anschließende Sequenzierung. Bei korrekt nachgewiesenem Einbau der Inserts wurden die Plasmid-Konstrukte in E.coli-Stamm Rosetta transformiert, um die GST-gekoppelten Fusionsproteine zu exprimieren.



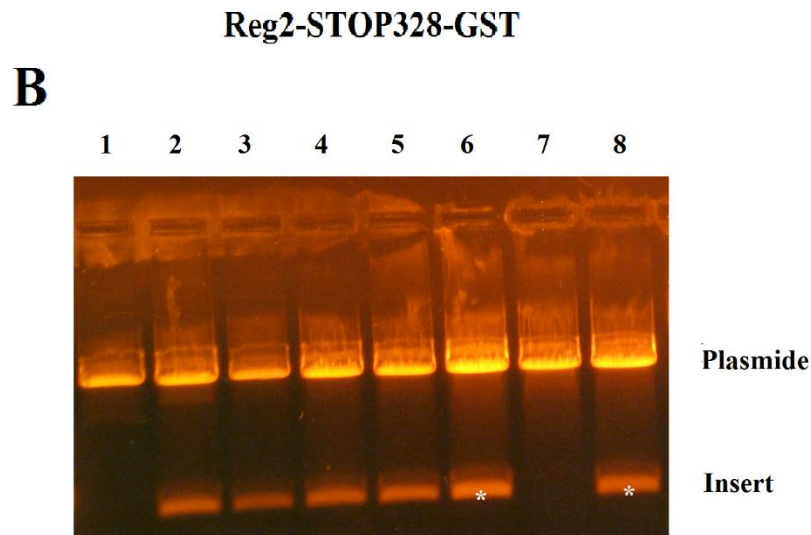


Abbildung 5: Kontrollverdau von pGEX-4T1 mit den Flotillin1-Inserts.

A: Es wurden jeweils 20 µl des Restriktionsverdaus von Reg2-CC-GST in den Taschen aufgetragen. In der Tasche 2 und 3 erkennt man die Inserts. Nach Sequenzierung der beiden Proben zeigte jedoch nur der mit * markierte Insert in der Tasche 2 einen korrekten Einbau in den Vektor pGEX-4T1. **B:** Es wurden jeweils 20 µl des Verdaus von Reg2-STOP328-GST in den Taschen gefüllt. Die mit * markierten Inserts in der Tasche 6 und 8 zeigten nach der Sequenzierung einen korrekten Einbau in den Vektor pGEX-4T1.

4.2 Induktion der GST-Fusionsproteine

Nachdem die Plasmide in E.coli-Stamm Rosetta transformiert wurden, erfolgte anschließend die Induktion der Proteinexpression über Nacht mit 0,15 mM IPTG. Flot-1-full length-GST wurde bereits zuvor in E.coli-Stamm Rosetta von der Arbeitsgruppe Tikkanen transformiert und für die Arbeit zur Verfügung gestellt.

Um die Wirkung der Induktion beurteilen zu können, wurden vor und nach der Induktion jeweils 1 ml der Proben zentrifugiert, die Pellets mit Ladepuffer versetzt, gekocht und anschließend auf die SDS-PAGE aufgetragen. Danach erfolgte die Sichtbarmachung mit Coomassie-Färbung (Abb.6).

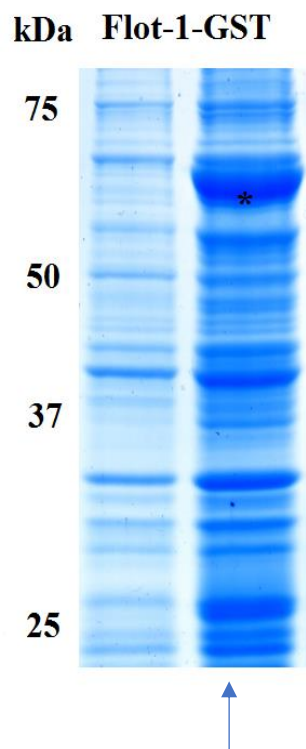
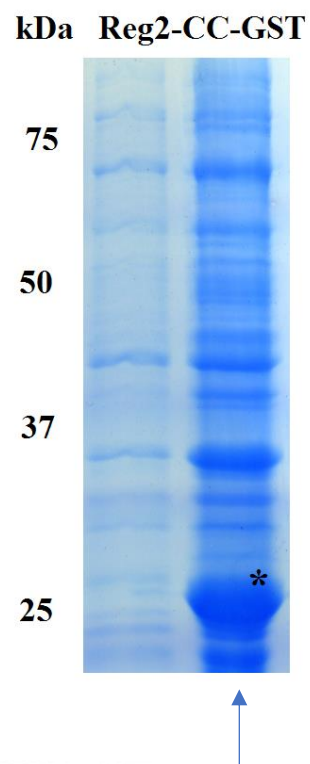
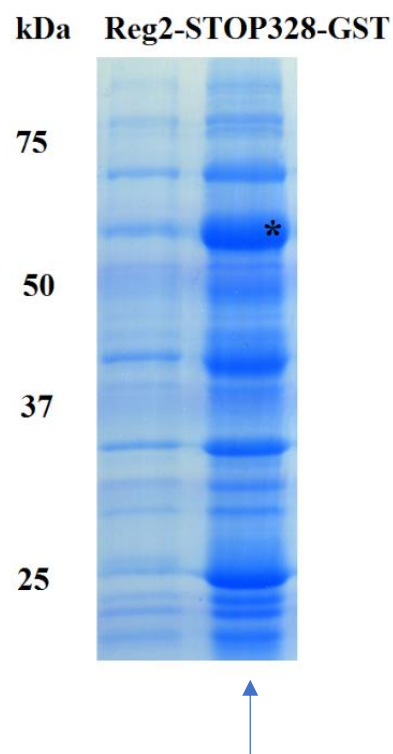
A**B****C**

Abbildung 6: Darstellung der Expression der Fusionsproteine nach Induktion mittels Coomassie-Färbung.

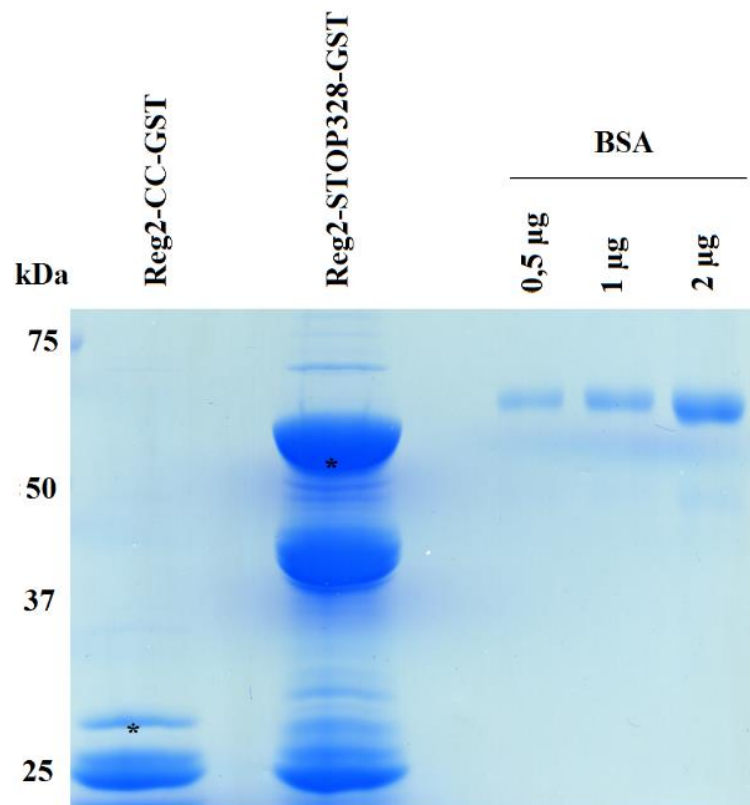
A-C: Die mit ↑ markierten Spuren stellen die Proteinexpression nach der Induktion dar.
Mit * markiert sind die gewünschten GST-gekoppelten Fusionsproteine.

4.3 GST-Affinitätsaufreinigung der Fusionsproteine

Nachdem die Fusionsproteine in E.coli-Stamm Rosetta exprimiert wurden, erfolgte die Aufreinigung mittels Glutathion-Sepharose. Durch die Bindung von Glutathion an den GST-Taq konnten die Fusionsproteine von den unerwünschten restlichen Proteinen aufgetrennt werden (Affinitätschromatographie).

Für die Mengenbestimmung der Fusionsproteine wurden die Ansätze gemeinsam mit bekannten Mengen an BSA auf die SDS-PAGE aufgetragen. Nach der Auftrennung wurden die Proteinbanden mit der Coomassie-Färbung angefärbt (Abb.7), sodass anschließend die Mengen an isolierten Fusionsproteinen durch Vergleich mit den Intensitäten der BSA Banden quantifiziert werden konnten. Bei Reg2-STOP328-GST war jedoch eine quantitative Auswertung der Menge an isoliertem Fusionsprotein nicht möglich, da die Menge auf dem Gel zu groß war. Daher konnte nur eine ungefähre Schätzung erfolgen.

A



B

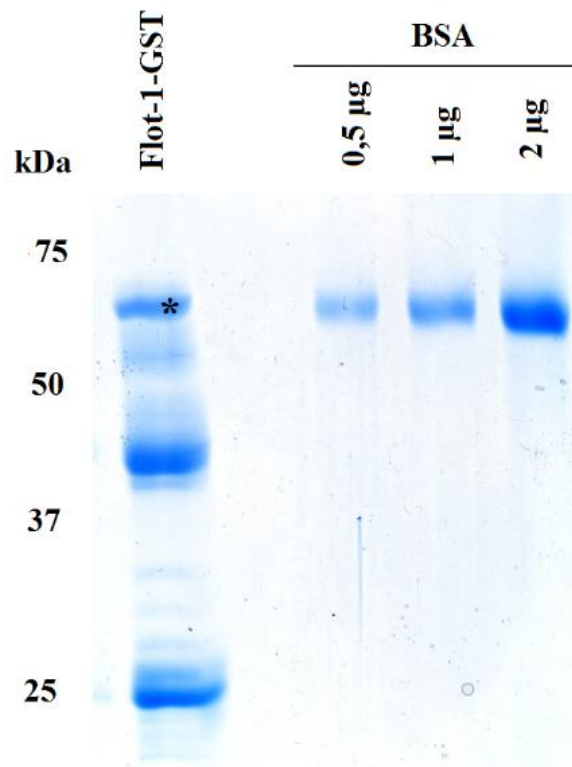


Abbildung 7: Dargestellt sind die aufgereinigten Fusionsproteine

A und B: Für die Quantifizierung wurden 0,5, 1, und 2 µg BSA als Vergleich verwendet. Die mit * markierten Banden zeigen die gewünschten Fusionsproteine. Neben den mit * markierten Banden sind weitere Banden zu erkennen, welche Abbauprodukte darstellen.

4.4 GST-Pulldown-Interaktionsanalysen

4.4.1 Interaktionen zwischen den Flotillin-1 Fragmenten (Flot-1-full length-GST, Reg2-CC-GST, Reg2-STOP328-GST) und dem Gag-GFP-Protein

Mithilfe eines GST-Pulldown-Verfahren ist es möglich, Proteininteraktionen zu analysieren. Die vorher exprimierten und anschließend isolierten Fusionsproteine konnten nun untersucht werden, ob sie mit dem Gag-GFP-Protein in Interaktion treten. HEK 293T-Zellen wurden hierfür zunächst mit Gag-GFP transfiziert und anschließend als Lysate für den GST-Pulldown verwendet. GFP diente als Tag, um Gag bei der Immundetektion detektieren zu können.

Für die Interaktionsanalyse wurden die Flot-1-Fusionsproteine, welche an den Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelt waren, zusammen mit 10% BSA, Lysat (HEK-293T-Zellen) und Lysepuffer versetzt. Danach erfolgte die Inkubation für 3 h bei 4°C auf dem Drehrad. Nach der Inkubation wurden die Protein-gekoppelten Beads mit CO-IP Puffer gewaschen, mit Ladepuffer versetzt und danach bei 94°C gekocht. Nachdem sich die Fusionsproteine von den Beads gelöst hatten, wurden sie mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf die Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit Ponceau S angefärbt. Danach erfolgte die Blockierung der Membran mittels 5% Milchlösung.

Nachdem die Membran geblockt wurde, erfolgte anschließend die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht, bevor nach Waschen der sekundäre Antikörper für 1h hinzugegeben wurde.

Alle drei Flot-1-Fusionsproteine wiesen eine Interaktion mit dem Gag-GFP auf (Abb.8). Während Reg2-STOP-328-GST die stärkste Interaktion aufzeigte, war bei Reg2-CC-GST die schwächste zu sehen. Flot-1-full length-GST zeichnete sich durch eine moderate Interaktion aus. Zusammenfassend lässt sich anhand des vorliegenden Experimentes andeuten, dass mehrere Flotillin-1 Abschnitte mit unterschiedlicher Intensität an der Interaktion zum Gag-Protein beteiligt sind.

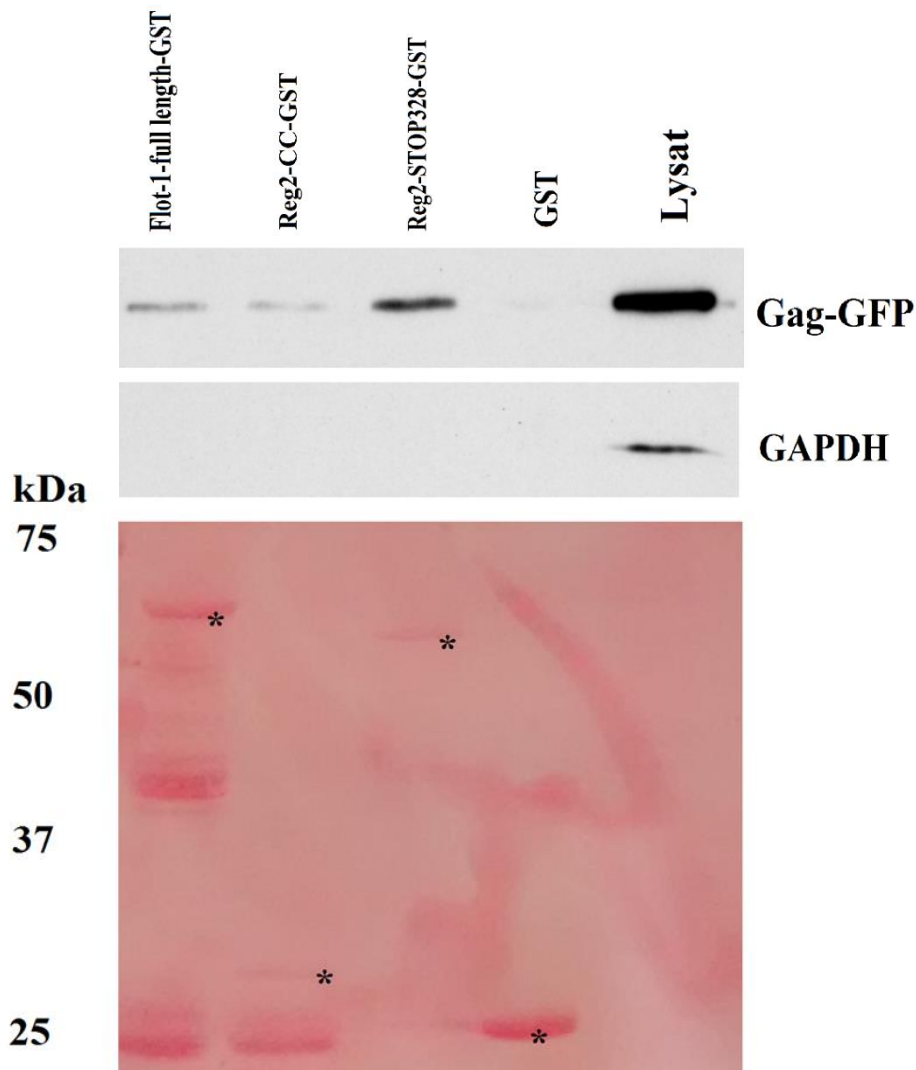


Abbildung 8: Interaktion zwischen den Flot-1-Fragmenten und dem Gag-GFP-Protein.

Jeweils 1,5 µg der Fusionsproteine (Flot-1-full length-GST, Reg-CC-GST und Reg2-STOP328-GST) wurden mit 100 µl 10% BSA und 500 µl Lysat versetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in der SDS-PAGE und dem Transfer auf der Membran, zeigte sich bei der Immundetektion des Gag-GFP-Proteins die stärkste Interaktion beim Reg2-STOP328-GST, während Reg2-CC-GST die schwächste aufwies. Flot-1-full length-GST zeigte eine moderate Interaktion auf. Für die Herstellung der Lysate wurden HEK 293T-Zellen verwendet. Diese wurden als positive Kontrolle aufgetragen. Reines GST hingegen wurde als Negativkontrolle verwendet, um eine falsche Interaktion auszuschließen. Bei der Immundetektion wurde der Antikörper anti-GFP in der Verdünnung 1/1000 verwendet, während anti-GAPDH im Verhältnis 1/50000 benutzt wurde. In der unten gezeigten Ponceau S Färbung stellen die mit * markierten Banden, die gewünschten Proteine auf der Membran dar. Die Lysate waren in der Ponceau S Färbung nicht eindeutig zu erkennen.

4.4.2 Interaktionsanalyse zwischen den Gag-Fragmenten (Gag-full length-GST, MA (p17)-GST, CA (p24)-GST, p6-GST) und dem Flotillin-1

Das Gag-Protein besteht aus den Proteinbestandteilen MA (p17), CA (p24), SP1, NC (p7), SP2 und p6 (siehe Einleitung Abb.2). Aus der früheren Arbeit von Meister *et al.* 2017 ist bekannt, dass das p6 und vor allem das MA (p17) in einem GST-Pulldown-Experiment mit dem Flotillin-1 interagieren, im Gegensatz zu CA (p24). Um nun genauer analysieren zu können, welcher Teil des MA (p17) am stärksten mit dem Flotillin-1 reagiert, wurde zunächst das GST-Pulldown-Experiment wiederholt, um die Interaktionen der Gag-Fragmente mit Flotillin-1 aufzuzeigen.

Hierfür wurden die GST-gekoppelten Fusionsproteine (Gag-, MA (p17)-, CA (p24)-, p6-GST) von der Arbeitsgruppe Tikkanen für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Anschließend wurden die Fusionsproteine mit Lysat (HeLa-Zellen) und 10 % BSA inkubiert, gewaschen und danach auf die SDS-PAGE aufgetragen. Nach anschließendem Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte die Immundetektion von Flotillin-1.

Bei der Detektion (Abb.9) waren sowohl bei Gag-full length-GST, als auch bei MA (p17)-GST nahezu gleichstarke Interaktionen zu erkennen. CA (p24)- und p6-GST zeigten hingegen keine Interaktionen auf. Beim Lysat (HeLa-Zellen), welches als positive Kontrolle diente, war Flotillin-1 detektierbar. GAPDH diente zur Ladekontrolle bzw. als Negativkontrolle für das GST-Pulldown.

Aus diesem Experiment lässt sich schließen, dass unter den einzelnen Gag-Fragmenten, MA (p17) die stärkste Interaktion mit dem Flotillin-1 aufzeigt, während CA (p24) und p6 anscheinend keine Rolle bei der Interaktion spielen.

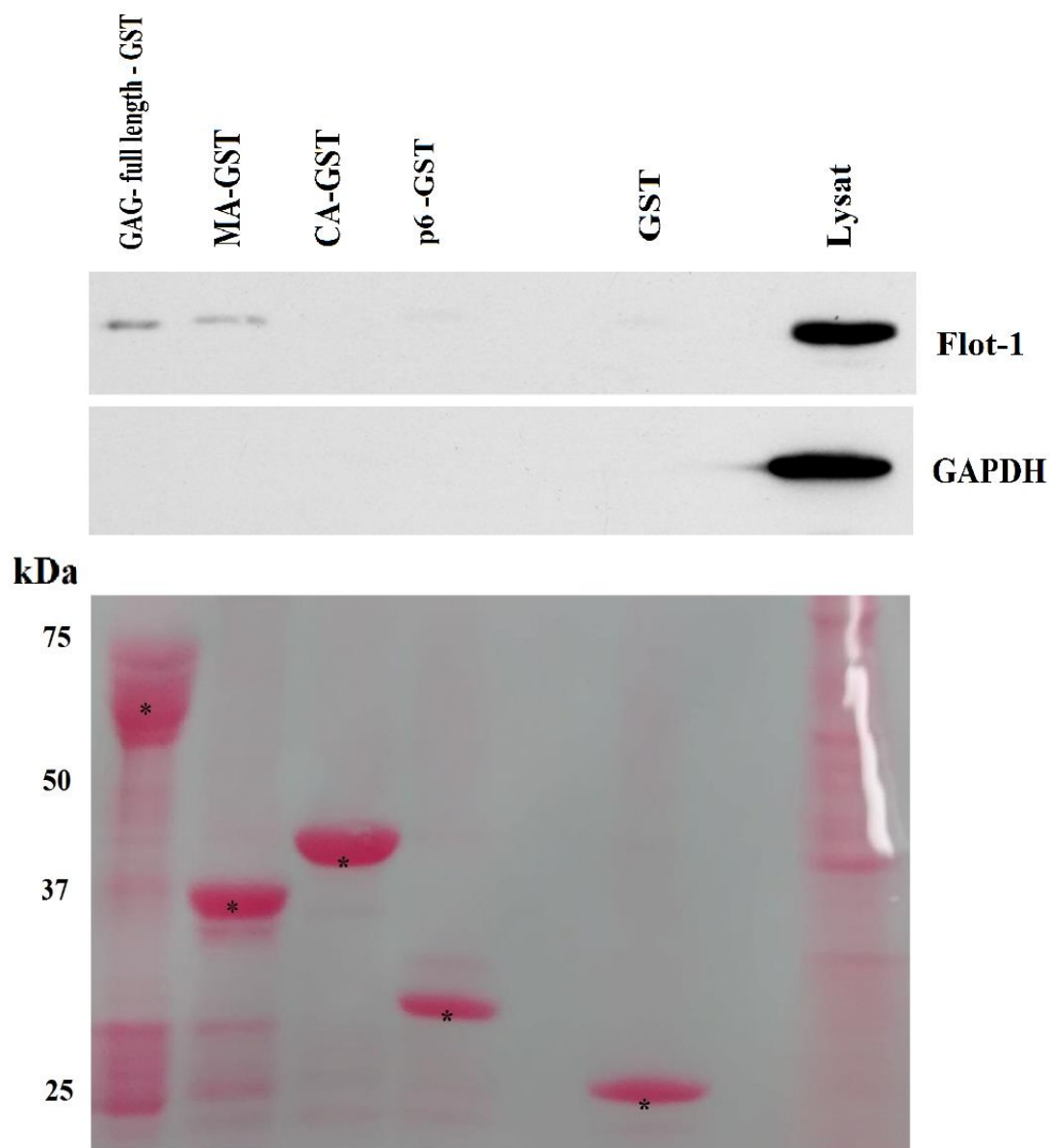


Abbildung 9: Interaktionsanalyse der Gag-Fragmente mit Flotillin-1.

Als Lysate für das Experiment wurden HeLa-Zellen verwendet. Jeweils 20 µg der Fusionsproteine wurden mit 900 µl Lysat (HeLa-Zellen) und 100 µl 10% BSA für 3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in der SDS PAGE und dem Transfer auf die Membran, erfolgte die Immundetektion. Sowohl bei Gag-full length-GST, als auch bei MA-GST, konnten eindeutige Signale erkannt werden. Während Gag-full length-GST und MA-GST nahezu gleichstarke Interaktionen zeigten, konnten hingegen bei CA-GST und p6-GST keine gesehen werden. Der Antikörper anti-Flotillin-1 wurde in der Verdünnung 1/1000 benutzt, während anti-GAPDH bei 1/10000 verwendet wurde. In der Ponceau S-Färbung zeigen die mit * markierten Banden die gewünschten Fusionsproteine und die Negativkontrolle GST auf der Nitrozellulosemembran an.

4.4.3 Interaktionen zwischen den MA (p17) Fragmenten (MA-full length-GST, MA-NT-GST, MA-CT-GST) und dem Flotillin-1

In dem zuvor durchgeführten GST-Pulldown-Experiment (Interaktionsanalyse der Gag-Fragmente mit Flotillin-1) zeigte sich, dass das MA (p17), im Gegensatz zu den anderen Fragmenten des Gag-Protein, bei der Interaktion mit dem Flotillin-1 eine zentrale Rolle einnimmt. Um nun genauer analysieren zu können, welche Abschnitte des MA (p17) für die Interaktion essenziell sind, wurde hierfür MA (p17) in zwei Teile (MA-NT und MA-CT) gesplittet. Der N-terminale Bereich beinhaltet die Aminosäuren 1-80, während die C-terminale Region die Aminosäuren 61-148 des Gag-Polypeptids enthält. Die Aminosäuren 61-80 stellen den Überlappungsbereich beider Fragmente dar. Das Interaktionsverhalten beider Fragmente wurde nun über ein weiteres GST-Pulldown-Experiment untersucht. Die GST-gekoppelten Fusionsproteine wurden hierfür von der Arbeitsgruppe Tikkanen zur Verfügung gestellt.

Für die Interaktion wurden die Fusionsproteine mit Lysat (HeLa-Zellen) und 10% BSA inkubiert. Nach anschließender Waschung mit dem CO-IP Puffer wurden die Pulldownansätze auf die SDS-PAGE aufgetragen, aufgetrennt und danach auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Im Anschluss erfolgte die Immundetektion von Flotillin-1.

Bei der Immundetektion war sowohl bei MA-full length-GST, als auch bei MA-NT- und MA-CT-GST eine Interaktion mit Flotillin-1 zu erkennen (Abb.10). Während MA-NT und MA-CT starke Interaktionen aufzeigten, war bei MA-full length-GST dagegen eine schwächere zu verzeichnen (bei etwas geringerer Proteinmenge auf der Ponceau S Färbung).

Aufgrund des starken Interaktionsverhalten von MA-NT als auch von MA-CT, lässt sich schließen, dass zumindest der Überlappungsbereich (Aminosäuren von 61-80) beider Fragmente eine zentrale Rolle bei der Interaktion zu Flotillin-1 einnimmt. Wie groß die genaue Interaktionsfläche im bzw. um den Überlappungsbereich ist, kann aus diesem Experiment letztendlich nicht genau definiert werden.

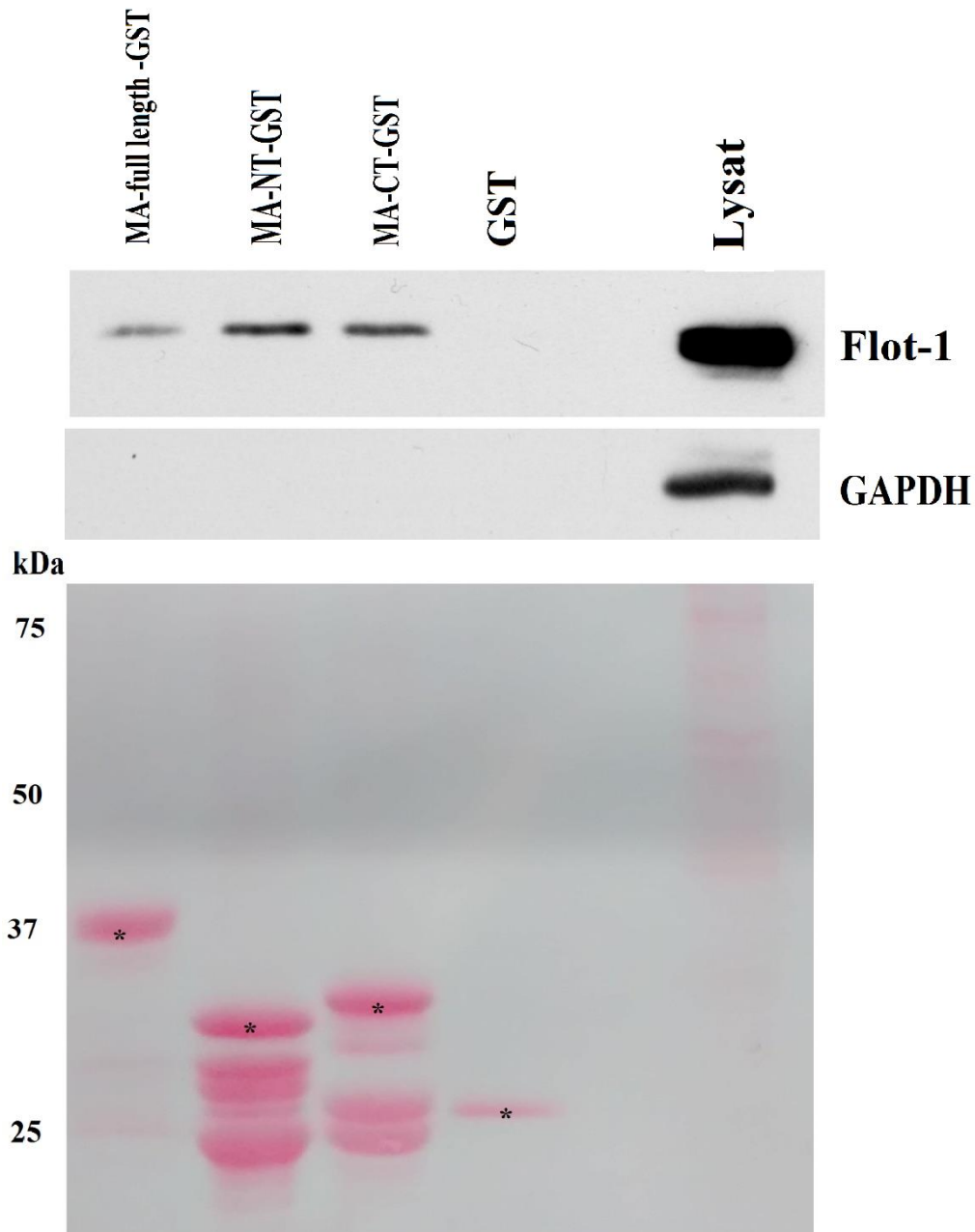


Abbildung 10: Interaktionsanalyse zwischen den MA (p17)-Fragmenten und Flotillin-1.

HeLa-Zellen wurden für die Herstellung der Lysate verwendet. Jeweils 10 µg der Fusionsproteine wurden mit 900 µl Lysat (HeLa-Zellen) und 100 µl 10% BSA für 3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nachdem waschen mit CO-IP-Puffer erfolgte die Auftrennung auf der SDS PAGE mit anschließendem Transfer auf die Membran. Bei der Immundetektion zeigten sowohl MA-full length-GST, als auch MA-NT- und MA-CT-GST eine Interaktion mit Flotillin-1 auf. Während bei MA-NT als auch bei MA-CT starke Interaktionen zu verzeichnen waren, zeigte MA-full length-GST eine schwächere Interaktion auf (bei etwas geringerer Proteinmenge auf der Ponceau S Färbung). Die in der Ponceau S Färbung mit * markierten Banden stellen die Proteine nach dem Transfer dar. Der Antikörper anti-Flotillin-1 wurde im Verhältnis 1/1000 und anti-GAPDH 1/10000 verwendet.

4.5 Bestimmung von Virus-ähnlichen Partikel (Virus-like Particles, VLP)

Das p6 Protein vom Gag beinhaltet die späte Domäne mit der Aminosäuresequenz PTAP (Prolin-Threonin-Alanin-Prolin), welches für die Ausknospung der neu hergestellten Viruspartikel aus der Zelle wichtig ist (Freed 2002; Ganser-Pornillos *et al.* 2012). Um die zentrale Bedeutung der PTAP-Sequenz bei der Generierung von VLPs beurteilen zu können, erfolgte daher der Aminosäureaustausch von Prolin gegen Leucin. Mit der hierdurch entstandenen Mutation (LTAL-Sequenz) konnte man nun überprüfen, inwiefern die Generierung der VLPs beeinträchtigt ist und ob Flotillin-1 hierbei eine Rolle spielt.

Für das vorliegende Experiment wurden HeLa- und F1-Knockout-HeLa-Zellen (F1-KOa) mit dem Wildtyp Gag-GFP und dem mutierten LTAL-Gag-GFP transfiziert. Dadurch werden Virus-ähnliche Partikel (Virus-like particles, VLP) freigesetzt. Nachdem man die VLPs im Medium für ca. 48 h gesammelt hatte, wurden die Zellen und das Medium getrennt geerntet. Danach erfolgte die Aufbereitung der beiden Komponenten.

Das Medium wurde hierfür filtriert und anschließend auf Saccharose Puffer pipettiert, ohne jedoch die zwei Phasen zu vermischen. Während nach der anschließenden Zentrifugation der Überstand entsorgt wurde, wurden die Pellets mit den VLPs in Lysepuffer lysiert, mit Ladepuffer versetzt und bei 94°C gekocht.

Die Zellen hingegen wurden zunächst mit Lysepuffer und Proteaseinhibitoren versetzt und auf Eis für eine halbe Stunde lysiert. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde eine geringe Menge des Überstandes mit Ladepuffer versetzt und ebenfalls bei 94°C erhitzt.

Nachdem die Proteine auf die SDS PAGE aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wurden, erfolgte danach der Transfer auf die Nitrozellulosemembran mit anschließender Immundetektion von Gag. Bei der Immundetektion konnte bei den transfizierten Proben das Gag-Protein in unterschiedlicher Intensität detektiert werden (Abb.11). GAPDH wurde zur Negativkontrolle aufgetragen.

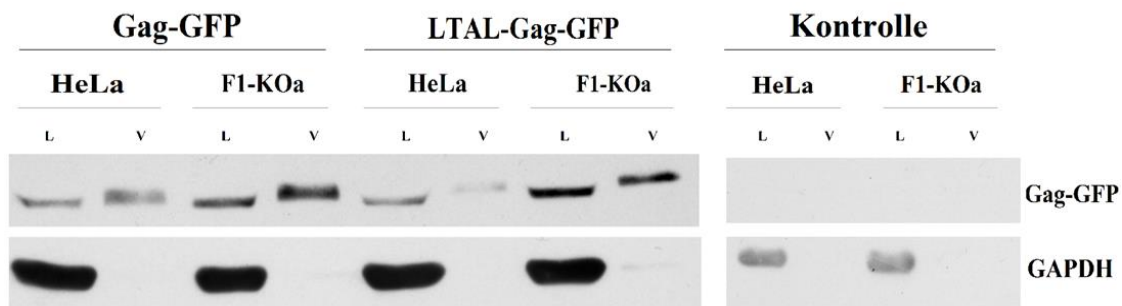


Abbildung 11: Immundetektion von Gag.

Wildtyp HeLa- und Flot-1-Knockout-HeLa-Zellen (F1KOa) wurden mit Gag-GFP und LTAL-Gag-GFP transfiziert. Anschließend wurden die VLPs im Medium für 48 h gesammelt. Danach wurden die Zellen und das Medium getrennt voneinander behandelt. **Medium:** 2 ml Medium wurden durch einen Filter filtriert. Danach wurde 1 ml filtriertes Medium auf Saccharose Puffer pipettiert, ohne die zwei Phasen zu vermischen. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, während die Pellets (VLP) lysiert und mit Ladepuffer versetzt wurden. **Zellpellets:** Die Pellets wurden für 30 Minuten auf Eis mit 10 µl Proteaseinhibitoren und 2 ml Lysepuffer lysiert. Nach der Zentrifugation wurde eine geringe Menge des Überstandes mit Ladepuffer versetzt. Jeweils 30 µl der oben genannten Proben (**L:Lysat**, **V:VLP**) wurden auf die SDS PAGE aufgetragen und auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Die Immundetektion von Gag erfolgte mit anti-GFP (1/000) und dem sekundären Antikörper. Anti-GAPDH (1/50000) wurde als Ladekontrolle aufgetragen. In der Kontrollgruppe zeigte sich keine Detektion von Gag, da diese Zellen nicht transfiziert wurden.

Zur Beurteilung der Menge an sezernierten Virus-ähnlichen Partikeln, wurden die Signalbanden mit *Quantity one* (Biorad) quantifiziert und als % der Gesamt-Gag in VLP angegeben (Abb.12). Aufgrund der statistisch fehlender Signifikanz konnte lediglich die Tendenz aufgezeigt werden, dass Flotillin-1-Knockout HeLa-Zellen (F1-KOa) mehr VLPs im Medium freisetzen, als die Zellen, die Flotillin-1 enthalten. Des Weiteren konnte bei den Flotillin-1-Knockout HeLa-Zellen die Tendenz beobachtet werden, dass die VLP-Generierung in den Wildtyp-Gag transfizierten- im Vergleich zu den LTAL-Gag transfizierten-Flotillin-1-Knockout-HeLa-Zellen zunahm. Bei den Wildtyp HeLa-Zellen konnte kein deutlicher Unterschied in der VLP-Generierung zwischen den LTAL-Gag- und Wildtyp-Gag-transfizierten Zellen beobachtet werden.

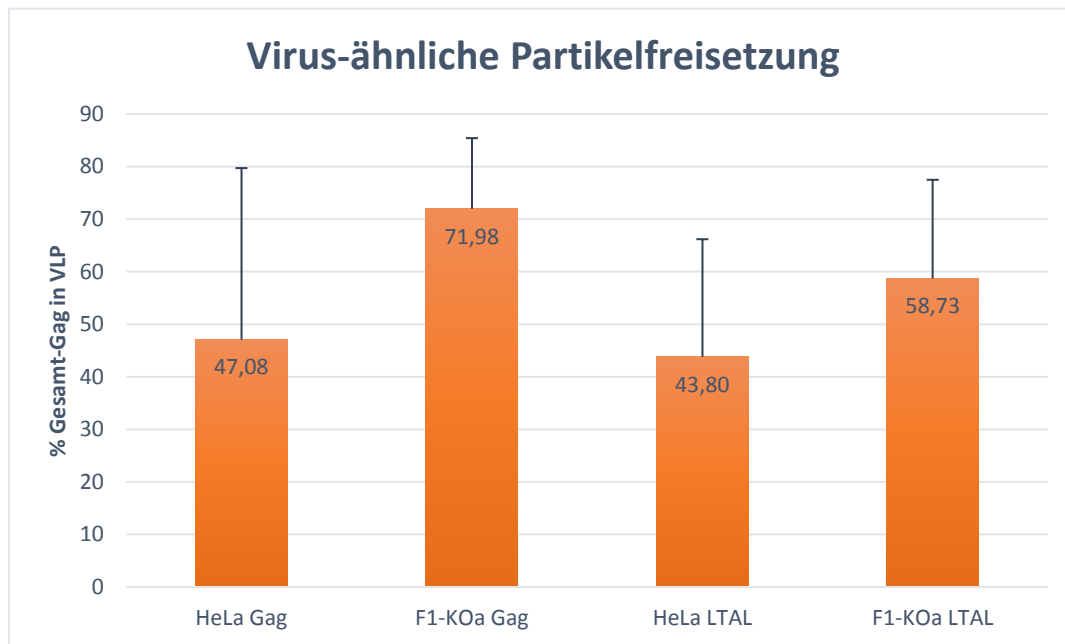


Abbildung 12: % der Gesamt-Gag in VLP.

Ausgewertet wurden drei Experimente, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Die Signalbanden wurden mit *Quantity one* (Biorad) ausgewertet und als % der Gesamt-Gag in VLP dargestellt. Aufgrund der statistisch fehlenden Signifikanz konnte lediglich die Tendenz gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Flotillin-1 die VLP-Produktion fördere. Weiterhin zeigte sich die Tendenz, dass die VLP-Produktion bei Wildtyp-Gag transfizierte F1-KOa-Zellen im Vergleich zu LTAL-Gag-transfizierte F1-KOa-Zellen zunahm. Bei den Wildtyp HeLa-Zellen konnte zwischen den Wildtyp-Gag- und LTAL-Gag-transfizierten Zellen kein eindeutiger Unterschied bei der VLP-Generierung beobachtet werden.

5. Diskussion

Sowohl die Assemblierung als auch die Freisetzung von HIV-1 spielen sich an den Membran-Mikrodomänen, den sogenannten *Lipid rafts* ab (Nguyen and Hildreth 2000; Suzuki and Suzuki 2006; Waheed and Freed 2009). Flotilline, welche ubiquitär exprimiert werden, sind ebenfalls mit den *Lipid rafts* assoziiert (Neuman-Giesen *et al.* 2004) und werden mit den Prozessen der Virusgenerierung von HIV-1 in Verbindung gebracht (Meister *et al.* 2017). *Lipid rafts* stellen dynamisch organisierte Bereiche in der Zellmembran dar, die vor allem Cholesterin- und Sphingolipid-reich sind (Pike 2004; Simons and Sampaio 2011).

Flotilline enthalten am N-terminalen Bereich eine SPFH-Domäne, die durch Lipidmodifikationen in der Lage ist, mit *Lipid rafts* zu interagieren (Marrow *et al.* 2002; Neuman-Giesen *et al.* 2004). Am C-terminalen Bereich befindet sich die Flotillin-Domäne, welche *coiled-coil* Strukturen enthält. Diese Domäne ist für die Oligomerisierung hauptverantwortlich und ist auch an der Membranassoziation mitbeteiligt (Bickel *et al.* 1997; Neuman-Giesen *et al.* 2004; Solis *et al.* 2007).

HIV-1 enthält in seinem Genom das *gag*-Gen (Fanales-Belasio *et al.* 2010), welches das 55 kDa große Gag-Protein (Spearman 2016) codiert, dass für den Zusammenbau und die Virusfreisetzung an der Plasmamembran der Wirtszelle verantwortlich ist. Das Gag-Protein besteht aus mehreren Untereinheiten, die verschiedene Funktionen ausüben. Für die Assoziation mit der Plasmamembran ist vor allen der MA-Abschnitt (p17) zuständig. Mithilfe der Myristinsäure und den elektrostatischen Wechselwirkungen der basischen Aminosäuren wird eine Interaktion mit den Lipiden der Wirtszellmembran vermittelt (Zhou *et al.* 1994; Hill *et al.* 1996; Chukkapalli *et al.* 2008). Während das CA (p24) an der Gag-Gag-Oligomerisierung wirkt, ist das NC (p7) für den Transport des viralen Genoms in neu produzierte Viruspartikel zuständig (Morellet *et al.* 1992; Rocquigny *et al.* 1992; Accola *et al.* 1998). Der p6 Abschnitt vermittelt schließlich die Virusfreisetzung durch späte Domänen (Waheed and Freed 2012; Ganser-Pornillos *et al.* 2012).

Aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Tikkanen (Beicht 2005; Koskimies 2013; Meister *et al.* 2017) ist bekannt, dass Flotillin-1 mit dem Gag-Protein in Interaktion treten kann. Da gezeigt werden konnte, dass Flotillin-2 keine wesentliche Interaktion aufweist (Beicht 2005; Meister *et al.* 2017), habe ich mich in der vorliegenden Arbeit auf das Flotillin-1 konzentriert.

5.1 Flotillin-1 Fragmente zeigen unterschiedliche Interaktionsintensitäten mit dem Gag-Protein

Die Interaktionsanalyse zwischen den Reggie-2/Flotillin-1-Fusionsproteinen und dem Gag-Protein erfolgte durch GST-Pulldown-Experimente. Hierfür wurden die Flotillin-1-Fragmente Reg2-STOP328 und Reg2-CC aus den in der AG-Tikkanen vorhandenen Yeast-2-Hybrid-Vektoren in den Zielvektor pGEX-4T1 umkloniert. Während Reg2-STOP328 von der N-terminalen Seite ausgehend die Aminosäuren 1-327 enthält, stellt Reg2-CC die Aminosäuren 328-428 an der C-terminalen Region des Flotillin-1 dar, die *coiled-coil*-Strukturen ausbilden können (Solis *et al.* 2007).

In dem Experiment konnte gezeigt werden, dass die stärkste Interaktion zwischen dem Reg-2-STOP328 und dem Gag-Protein vorhanden war, während das gesamte Flotillin-1 eine schwächere Interaktion aufwies. Die schwächste Interaktion zum Gag-Protein war beim Reg2-CC zu verzeichnen.

Eine Annahme, weshalb das Reg2-STOP328 mit dem Gag-Protein am stärksten interagiert, könnte sein, dass es womöglich eine andere Tertiärstruktur einnimmt als das gesamte Flotillin-1. Durch eine veränderte Konformation wäre es möglich, dass Reg2-STOP328 optimalere Bedingungen für eine Interaktion aufweist als das gesamte Flotillin-1. Eine andere Erklärung für die starke Interaktion von Reg2-STOP328 könnte darin liegen, dass die Gag-Bindungsstelle generell besser zugänglich ist, wenn der C-terminale Abschnitt (AS: 328-428) von Flotillin-1 fehlt.

In den Arbeiten von Beicht (2005) und Koskimies (2013) konnte ebenfalls aufgezeigt werden, dass das Fragment Reg2-STOP328 stark mit dem Gag-Protein interagiert. In der Arbeit von Beicht (2005) konnte mit einer In vitro-Translations-Bindungsstudie gezeigt werden, dass das Fragment Reg2-STOP328 mit dem Gag-Protein interagiert. Über die In vitro-Translations-Bindungsstudie und dem Yeast-Two-Hybrid-System hat er weitere Flotillin-1-Fragmente analysiert und ist zu der Schlussfolgerung gekommen, dass der Aminosäuren Abschnitt 226-327 die Bindungsstelle für das Gag-Protein dargestellt.

Koskimies (2013) konnte über ein Yeast-Two-Hybrid-System direkt nachweisen, dass Reg2-STOP328 in der Lage war, mit dem Gag-Protein zu interagieren. Nachdem er weitere Flotillin-1-Fragmente über das Yeast-Two-Hybrid-System untersucht hatte, hat er schließlich den Aminosäuren Abschnitt 228-328 von Flotillin-1 für die Interaktion mit

dem Gag verantwortlich gemacht (nahezu identischer Aminosäuren Abschnitt wie es zuvor Beicht (2005) postuliert hatte).

Die schwache Interaktion beim Reg2-CC in der vorliegenden Arbeit könnte damit begründet werden, dass die *coiled-coil* Strukturen generell nicht gut geeignet sind, um Wechselwirkungen speziell mit dem Gag Protein einzugehen, obwohl bekannt ist, dass solche Strukturen gerne in Interaktion auftreten. In der Arbeit von Beicht (2005) hatte sich gezeigt, dass Reg2-CC nicht in der Lage war, mit dem Gag-Protein in einer In vitro Translations-Bindungsstudie zu interagieren. Ob die *coiled-coil* Strukturen beim Reg2-CC eine andere Konformation einnehmen als in dem gesamten Flotillin-1, welche vielleicht die Interaktion zum Gag abschwächen, könnte in einer weiterführenden Arbeit näher untersucht werden.

5.2 Die zentrale Bedeutung vom MA (p17) in der Interaktion mit dem Flotillin-1

Bei der Interaktionsanalyse zwischen den Gag-Bausteinen und dem Flotillin-1 im GST-Pulldown war beim gesamten Gag und MA (p17) eine nahezu gleichstarke Interaktion zu verzeichnen. CA (p24) und p6 zeigten hingegen keine Interaktionen mit Flotillin-1 auf. Nach Betrachtung dieser Ergebnisse scheint MA (p17) der wichtigste Baustein für die Interaktion mit dem Flotillin-1 zu sein (Abb.13).

Ein ähnliches GST-Pulldown-Experiment ist zuvor von Meister *et al.* (2017) durchgeführt worden. Bei diesem Experiment konnte ebenfalls eine starke Interaktion von MA(p17) zum Flotillin-1 gesehen werden. Zusätzlich konnte eine schwache Interaktion von p6 mit dem Flotillin-1 verzeichnet werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Deletion von MA(p17) die Interaktion des Gag-Proteins mit dem Flotillin-1 abschwächte.

In den Arbeiten von Beicht (2005) und Koskimies (2013) konnte jedoch eine Interaktion von MA (p17) mit Flotillin-1 über Yeast-Two-Hybrid-Systeme dagegen nicht aufgezeigt werden. Stattdessen konnte mit dieser Methode bei beiden Arbeiten eine starke Interaktion zu CA (p24) und eine schwächere zu p6 nachgewiesen werden. Die Interaktionsanalyse zweier Proteine durch Yeast-Two-Hybrid-Systeme erfolgt durch einen Transkriptionsfaktor (GAL4) im Zellkern der Hefen. Der Transkriptionsfaktor enthält eine DNA-Bindungsdomäne (BD) und eine Domäne, die die Transkription aktiviert (AD). Trennt man beide Domänen auf und koppelt jeweils eine Domäne an eines der zu untersuchenden

Proteine, so ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors dennoch möglich, wenn beide zu untersuchenden Proteine miteinander interagieren. Durch die Interaktion beider Proteine werden beide Domänen näher aneinander gebracht, und der Transkriptionsfaktor wird aktiv, sodass die anschließenden Reportergene exprimiert werden. Mithilfe der Reportergene werden die Interaktionen der zu untersuchenden Proteine sichtbar gemacht. Da jedoch diese Prozesse im Zellkern der Hefen stattfinden, ist es möglich, dass die Gag-Fragmente eine andere Konformation einnehmen als außerhalb des Zellkerns oder *in vitro* (wie beim GST-Pulldown-Experiment). Durch veränderte Konformationen der Gag-Fragmente wäre es möglich, dass CA (p24) und p6 mit Flotillin-1 interagieren und MA (p17) nicht.

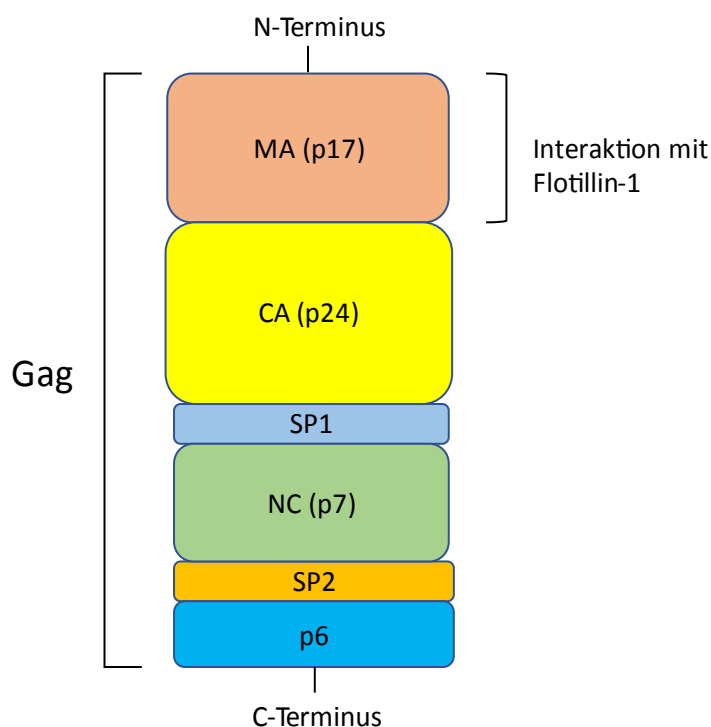


Abbildung 13: Interaktion der Gag-Fragmente mit Flotillin-1.

Das gesamte Gag-Protein und der Gag-Baustein MA (p17) zeigten eine Interaktion mit Flotillin-1. Bei CA (p24) und p6 waren keine zu erkennen. SP1, SP2 und NC (p7) wurden nicht untersucht.

5.3 MA-NT und MA-CT zeigen starke Interaktion mit Reggie-2/Flotillin-1

Da sich im zuvor durchgeführten GST-Pulldown-Experiment zeigte, dass MA (p17) die entscheidende Komponente in der Interaktion zum Flotillin-1 zu sein scheint, sollte nun genauer charakterisiert werden, welcher Abschnitt von MA (p17) die größte Rolle bei der Interaktion spielen könnte.

Hierfür wurden zwei Fragmente von MA (p17) verwendet. Das erste Fragment MA-NT enthält den N-terminalen Bereich mit den Aminosäuren 1-80, während das zweite Fragment MA-CT die C-terminale Region mit dem Aminosäurenabschnitt 61-148 darstellt. Die Aminosäuren 61-80 zeigen den Überlappungsbereich beider Fragmente an.

In dem durchgeführten GST-Pulldown-Experiment war sowohl bei MA-NT, als auch bei MA-CT eine starke Interaktion mit dem Flotillin-1 zu verzeichnen. Das gesamte MA (p17) hingegen zeigte eine schwächere Interaktion auf (bei etwas geringerer Proteinmenge auf der Ponceau S Färbung).

Da sowohl MA-NT als auch MA-CT mit dem Flotillin-1 stark interagierten, lässt sich aus dem Experiment schließen, dass zumindest der Überlappungsbereich mit dem Aminosäurenabschnitt 61-80 eine zentrale Rolle für die Interaktion mit dem Flotillin-1 spielt (Abb.14). Wie groß die Interaktionsfläche im bzw. um den Überlappungsbereich ist, kann aus diesem Experiment nicht genau bestimmt werden.

Um die Interaktionsfläche von MA (p17) in Zukunft näher eingrenzen zu können, könnte man den Überlappungsbereich von MA (p17) in weitere Fragmente splitten und dessen Interaktionsverhalten mit Flotillin-1 untersuchen. Des Weiteren gäbe es noch die Möglichkeit, einzelne Aminosäuren im bzw. um den Überlappungsbereich auszutauschen und damit Interaktionsanalysen mit dem Flotillin-1 durchzuführen.

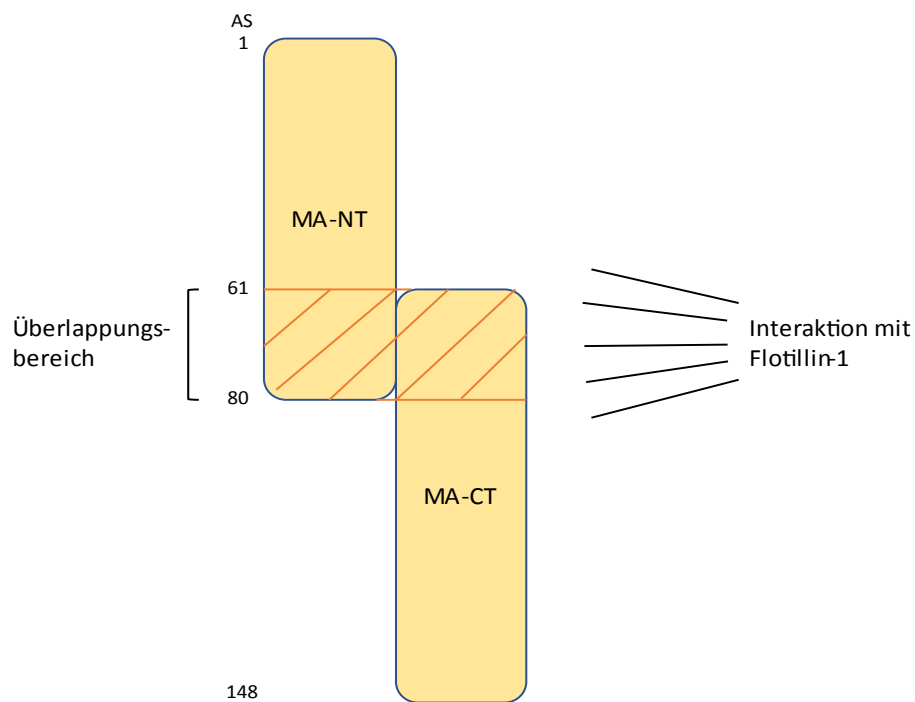


Abbildung 14: Interaktion von MA-NT und MA-CT mit Flotillin-1.

Dargestellt ist die Interaktion von MA-NT und MA-CT mit Flotillin-1. Beide Fragmente zeigten im GST-Pulldown-Experiment starke Interaktionen auf, was darauf zurück schließen lässt, dass zumindest der Überlappungsbereich (rot schraffierte Fläche) mit den Aminosäuren (AS) 61-80 an der Interaktion beteiligt ist. Wie groß die Interaktionsfläche im Überlappungsbereich ist, kann aus diesem Experiment nicht genau definiert werden.

5.4 Generierung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLP)

Das Gag-Protein ist in der Lage, Virus-ähnliche Partikel (VLP) auch ohne weitere virale Genomsequenzen zu erzeugen (Freed 1998; Scarlata and Carter 2003; Spearman 2016). An der Freisetzung der Virus-ähnlichen Partikel ist vor allem das p6 vom Gag-Protein beteiligt. Es beherbergt eine PTAP-Sequenz, welche an die Untereinheit des ESCRT-Komplex-I, dem Tsg101, bindet. Auf diese Weise werden die weiteren ESCRT-Komplexe rekrutiert, die anschließend für die Ausknospung der VLPs verantwortlich sind (VerPlank *et al.* 2001; Freed 2015).

In meinen Resultaten zur VLP-Generierung war in Flotillin-1-Knockout-HeLa-Zellen lediglich die Tendenz zu verzeichnen (bei fehlender statistischer Signifikanz), dass in der Abwesenheit von Flotillin-1, die VLP-Produktion zunimmt. In der Arbeit von Koskimies (2013) konnte zuvor aufgezeigt werden, dass die VLP-Produktion nach Unterdrückung der Flotillin-1-Expression in Flotillin-1-Knockdown-HeLa-Zellen zunimmt. Meister *et al.* (2017) konnte sowohl mit Flotillin-1-Knockdown-HeLa-Zellen als auch mit Flotillin-1-Knockout -293T-Zellen ebenfalls eine steigende VLP-Freisetzung im Vergleich zu Flotillin-1 enthaltenen Zellen beobachten. Bis heute konnten keine eindeutigen Erklärungen für das Phänomen der steigenden VLP-Generierung bei der Abwesenheit von Reggie-2/Flotillin-1 gefunden werden.

Des Weiteren wurde bei der vorliegenden Arbeit der Einfluss der PTAP-Sequenz in Gag bei der VLP-Freisetzung untersucht. Hierfür tauschte man die Aminosäure Prolin gegen Leucin aus, sodass man die LTAL-Sequenz erhielt. Normalerweise würde man vermuten, dass aufgrund der veränderten Gensequenz die VLP-Produktion in den mit LTAL-Gag-transfizierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Gag-transfizierten Zellen abnehmen müsste. Bei den Wildtyp HeLa-Zellen waren jedoch die Unterschiede bei der VLP-Generierung zwischen den LTAL- und den Wildtyp-Gag-transfizierten-Zellen viel zu gering. In den Flotillin-1-Knockout-Zellen hingegen konnte ein Unterschied beobachtet werden. Die mit dem Wildtyp-Gag transfizierten F1-KOa-HeLa-Zellen zeigten eine größere VLP-Generierung an im Vergleich zu LTAL-Gag-transfizierte F1-KOa-HeLa-Zellen. Aufgrund der statistisch fehlenden Signifikanz lässt sich aber lediglich die Tendenz beobachten, dass in der Abwesenheit von Flotillin-1, die PTAP-Sequenz im Gag einen größeren Einfluss bei der VLP-Generierung auszuüben scheint, als wenn Flotillin-1 in den Zellen vorhanden ist.

Gründe für die nichtvorhandene statistische Signifikanz bei den Ergebnissen liegen in den vielen nacheinander durchgeführten Schritten bis zur Ergebnisdarstellung. Von der Transfektion der Zellen, über die Isolierung der VLPs bis zum Western-Blot, können viele kleine Fehler passieren, die sich aufsummieren und am Ende ein nicht signifikantes Ergebnis liefern.

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Alle Flotillin-1 Fragmente zeigten im GST-Pulldown-Experiment eine Interaktion mit dem viralen Gag-Protein. Während die stärkste Interaktion im Aminosäuren Bereich zwischen 1-327 (Reg2-STOP328) vorhanden war, zeigte sich die schwächste Wechselwirkung im Aminosäuren Abschnitt von 328-428 (Reg2-CC). Beim gesamten Flotillin-1 war eine moderate Interaktion zu verzeichnen.

Momentan gehen wir davon aus, dass mehrere Abschnitte des Reggie-2/Flotillin-1 an der Interaktion zum Gag beteiligt sein könnten. Vor allem der Bereich der Aminosäuren 1-327 scheint eine wichtige Rolle bei der Interaktion zu spielen. Die unterschiedlichen Interaktionsstärken der einzelnen Flot-1-Fragmente im Vergleich zum gesamten Flotillin-1 lässt sich vermutlich durch veränderte Konformation erklären, welche die Fragmente als Einzelbestandteile einnehmen als sie es als Bestandteil des gesamten Flotillin-1 tun.

Um die Interaktionsfläche von Reggie-2/Flotillin-1 weiter einzugrenzen, könnte man in zukünftigen Arbeiten weitere Flotillin-1 Konstrukte herstellen oder einzelne Aminosäuren austauschen und über GST-Pulldown-Experimente untersuchen. Aus früheren Arbeiten der AG Tikkanen konnte bereits mit anderen Methoden die Interaktionsfläche von Flotillin-1 näher charakterisiert werden (siehe Abschnitt 5.1).

Beim Interaktionspartner Gag scheint vor allem dessen Proteinbestandteil MA (p17) mit dem Flotillin-1 zu assoziieren. In dem GST-Pulldown-Experiment konnte gezeigt werden, dass MA(p17) mit dem Flotillin-1 interagiert, während CA (p24) und p6 dies nicht taten. Vor allem der Bereich im bzw. um die Aminosäuren 61-80 von MA (p17) scheint an der Interaktion zum Reggie2/Flotillin-1 beteiligt zu sein.

Aus früheren Arbeiten der AG-Tikkanen konnte aufgezeigt werden, dass auch andere Abschnitte des Gag-Protein in der Lage sind, mit dem Flotillin-1 zu interagieren (siehe Abschnitt 5.2). Daher kann momentan nicht eindeutig postuliert werden, welcher

Abschnitt von Gag für die Interaktion hauptverantwortlich ist. Um diese Frage genauer verifizieren zu können, wäre es sinnvoll, in Zukunft weitere Methoden wie Ko-Immunitäzitation oder Förster Resonanz-Spektroskopie bei der Interaktionsanalyse mit einzubeziehen.

Bei der VLP-Generierung konnte die Tendenz beobachtet werden, dass Reggie-2/Flotillin-1 einen relevanten Einfluss ausübt. Die Abwesenheit von Flotillin-1 scheint die Freisetzung von VLPs zu steigern, was bereits in früheren Arbeiten der AG-Tikkanen (Koskimies 2013; Meister *et al.* 2017) verzeichnet werden konnte. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass beim Fehlen von Flotillin-1, die PTAP-Sequenz in Gag einen größeren Einfluss mit einhergehender Steigerung der VLP-Generierung einnimmt als in der Anwesenheit von Flotillin-1. Wegen der statistisch fehlenden Signifikanz wäre es empfehlenswert das Experiment in einer weiterführenden Arbeit erneut zu wiederholen, um weitere Aussagen über Gag in Bezug zu Flotillin-1 bei der VLP-Generierung treffen zu können.

6. Zusammenfassung

Flotilline sind Membranproteine, die aus zwei Domänen bestehen und mit *Lipid rafts* assoziieren. Während die SPFH-Domäne mit den *Lipid rafts* in Interaktion tritt, ist die Flotillin-Domäne neben der Beteiligung an der Membranassoziation hauptverantwortlich für die Oligomerisierung der beiden Membranproteine. Flotilline wirken an verschiedenen zellulären Prozessen wie beispielsweise der Endozytose, Sortierung von Proteinen, Zelladhäsionen oder Virusfreisetzung mit.

Das virale HIV-1 Gag-Protein ist für die Assemblierung und Ausknospung der neu gebildeten Viruspartikel an der Plasmamembran verantwortlich. Diese zellulären Prozesse finden an *Lipid rafts* statt, wo auch die Flotilline lokalisiert sind. Für die Freisetzung der neu hergestellten Viruspartikeln ist das p6-Protein von Gag, vor allem die PTAP-Sequenz, verantwortlich.

In dieser Arbeit konnte mit GST-Pulldown gezeigt werden, dass mehrere Abschnitte von Flotillin-1 mit dem Gag-Protein in Interaktion treten können. Der Aminosäuren Bereich von 1-327 des Flotillin-1 scheint eine bedeutende Rolle bei der Interaktion zum Gag-Protein einzunehmen, während dagegen der Aminosäuren Abschnitt von 328-428 in schwacher Interaktion mit dem Gag-Protein auftrat.

Der Interaktionspartner Gag hingegen zeigte im GST-Pulldown-Experiment mit seinem Proteinbaustein MA (p17) eine Interaktion mit dem Flotillin-1 auf. Dabei konnte im bzw. um den Aminosäuren Bereich zwischen 61-80 des MA (p17) die Interaktion zu Flotillin-1 näher charakterisiert werden. Bei CA (p24) und p6 konnte in dieser Arbeit keine Interaktion verzeichnet werden.

Bei der Beurteilung, inwiefern Flotillin-1 und die PTAP-Sequenz von Gag einen Einfluss auf die VLP-Generierung ausüben, konnte die Tendenz beobachtet werden, dass in der Abwesenheit von Flotillin-1 die VLP-Produktion zunahm. Weiterhin zeigte sich die Tendenz auf, dass in der Abwesenheit von Flotillin-1, die PTAP-Sequenz in Gag einen größeren Einfluss auf die VLP Produktion nahm, was sich durch einen größeren Unterschied in der VLP Generierung zwischen den Flotillin-1-Knockout-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen bemerkbar machte.

7. Summary

Flotillins are lipid raft-associated membrane proteins that comprise two major domains. While the SPFH-domain interacts with lipid rafts, the flotillin domain is mainly responsible for the oligomerization of the two membrane proteins, in addition to being involved in membrane association. Flotillins are involved in various cellular processes such as endocytosis, sorting of proteins, cell adhesion or virus release.

The viral HIV-1 Gag protein is responsible for the assembly and budding of newly formed virus particles at the plasma membrane. These cellular processes take place within lipid rafts, where the flotillins are also located. The p6 part of Gag, especially the PTAP sequence, is responsible for the release of newly produced virus particles.

In this work, GST pulldown was used to show that several amino acid stretches of flotillin-1 can interact with the Gag protein. The amino acid region 1-327 of flotillin-1 appears to play an important role in the interaction with the Gag protein, while the amino acid region 328-428 interacts weakly with the Gag protein.

On the other hand, the interaction of Gag with flotillin-1 was mediated by its protein component MA (p17) in GST pulldown experiments. The interaction with flotillin-1 could be further localized at or around the amino acid region 61-80 of the MA (p17). In this work, no interaction could be detected for CA (p24) and p6.

When assessing the extent to which flotillin-1 and the PTAP sequence of Gag exert an influence on VLP release, a tendency was observed for VLP production to increase in the absence of flotillin-1. Furthermore, in the absence of flotillin-1, the PTAP sequence in Gag tended to have a greater impact on VLP production. This difference in VLP release was larger in flotillin-1 knockout-cells than in the wild-type cells.

8. Literaturverzeichnis

Accola, M.A.; Höglund, S.; Göttlinger, H.G. (1998) A Putative α -Helical Structure Which Overlaps the Capsid-p2 Boundary in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Precursor Is Crucial for Viral Particle Assembly.

Journal of Virology 72(3):2072-2078

Arastéh, K.; Baenkler, H-W.; Bieber, C. *et al.* (2009) Duale Reihe Innere Medizin. 2.Auflage. Georg Thieme Verlag p.1105-1108, 1110, 1112-1114

Beicht, P. (2005) Interaktion von Reggie-2/Flotillin-1 mit HIV-1 Gag: Funktionelle Aspekte der Assemblierung und Ausschleusung Virus-ähnlicher Partikel. *Dissertation an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main*

Berger, E.A.; Murphy, P.M.; Farber, J.M. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual Review of Immunology* 17:657-700

Bickel, P.E.; Scherer, P.E.; Schnitzer, J.E.; Oh, P.; Lisanti, M.P.; Lodish, H.F. (1997) Flotillin and Epidermal Surface Antigen Define a New Family of Caveolae-associated Integral Membrane Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 272(21):13793-13802

Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz (2004) Humanes Immunschwächevirus (HIV). *Springer-Verlag*, 47(1):83-95
doi 10.1007/s00103-003-0753-8

Chukkapalli, V.; Hogue, I.B.; Boyko, V.; Hu, W-S.; Ono, A. (2008) Interaction between the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Matrix Domain and Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphonate Is Essential for Efficient Gag Membrane Binding. *Journal of Virology* 82(5):2405-2417

Earl, P.L.; Moss, B.; Doms, R.W. (1991) Folding, Interaction with GRP78-BiP, Assembly, and Transport of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein. *Journal of Virology* 65 (4): 2047-2055

Esbjörnsson, J.; Jansson, M.; Jespersen, S.; Månsson, F.; Hønge, B.L.; Lindman, J.; Medina, C.; Da Silva, Z.J.; Norrgren, H.; Medstrand, P.; Rowland-Jones, S.L.; Weijse, C. (2019) HIV-2 as a model to identify a functional HIV cure. *AIDS Research and Therapy* 16(1):24

- Fanales-Belasio, E.; Raimondo, M.; Suligoi, B.; Buttò, S. (2010) HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita* 46 (1): 5-14
- Freed, E.O. (1998) HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology* 251(1):1-15
- Freed, E.O. (2002) Viral Late Domains. *Journal of Virology* 76(10):4679-4687
- Freed, E.O. (2015) HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature reviews. Microbiology* 13(8):484-496
- Frick, M.; Bright, N.A.; Riento, K.; Bray, A.; Merrified, C.; Nichols, B.J. (2007) Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Current Biology* 17(13):1151-1156
- Ganser-Pornillos, B.K.; Yeager, M.; Pornillos, O. (2012) Assembly and Architecture of HIV. *Advances in experimental medicine and biology* 726: 441-465
- Gauthier-Rouvière, C.; Bodin, S.; Comunale, F.; Planchon, D. (2020) Flotillin membrane domains in cancer. *Cancer Metastasis Reviews* 39(2):361-374
- Glebov, O.O.; Bright, N.A.; Nichols, B.J. (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature Cell Biology* 8(1):46-54
- Hill, C.P.; Worthylake, D.; Bancroft, D.P.; Christensen, A.M.; Sundquist, W.I. (1996) Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *PNAS USA* 93(7):3099-3104
- Hof, H. and Dörries, R. (2009) Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 4.Auflage. *Georg Thieme Verlag*, p.145-146, 233
- Hoffmann, C. and Rockstroh, J. K. (2020) HIV 2020/2021 www.hivbuch.de , *Medizin Fokus Verlag*, p.4-6, 21-25, 45, 50, 63, 70, 86-90, 124-125, 128-129, 160, 186
- Hurley, J.H. (2008) ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current opinion in cell biology* 20(1):4-11
- Jacobowitz, D.M and Kallarakal, A.T. (2004) Flotillin-1 in the substantia nigra of the Parkinson brain and a predominant localization in catecholaminergic nerves in the rat brain. *Neurotoxicity Research* 6(4): 245-257

- Korber, B.; Foley, B.; Leitner, T.; McCutchen, F.; Hahn, B.; Mellors, J.W.; Myers, G.; Kuiken, C. (1997) Human Retroviruses and AIDS 1997. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. *Los Alamos National Laboratory. Los Alamos, New Mexico (USA). Technical Report*: p.v-x <https://doi.org/10.2172/607510>
- Koskimies, J.O.A. (2013) Role of raft protein reggie-2/flotillin-1 in HIV-1 Gag cellular localization. *Dissertation an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main*
- Ku, P.-I.; Bendjennat, M.; Ballew, J.; Landesman, M.B.; Saffarian, S. (2014) ALIX Is Recruited Temporarily into HIV-1 Budding Sites at the End of Gag Assembly. *PLOS ONE* 9(5):e96950
- Kurrl, N.; Völlner, F.; Eming, R.; Hertl, M.; Banning, A.; Tikkanen, R. (2013) Flotillins directly interact with γ -catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PLOS ONE* 8(12):e84393
- Levy, J.A. (1993) Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiological Reviews* 57(1): 183-289
- Liu, R.; Paxton, W.A.; Choe, S.; Ceradini, D.; Martin, S.R.; Horuk, R.; MacDonald, M.E.; Stuhlmann, H.; Koup, R.A.; Landau, N.R. (1996) Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell* 86 (3):367-377
- Löffler, G. (2008) Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 7.Auflage. *Springer Medizin Verlag*, p.287-288
- Meister, M.; Bänfer, S.; Gärtner, U.; Koskimies, J.; Amaddi, M.; Jacob, R.; Tikkanen, R. (2017) Regulation of cargo transfer between ESCRT-0 and ESCRT-I complexes by flotillin-1 during endosomal sorting of ubiquitinated cargo. *Oncogenesis* 6(6):e344
- Morellet, N.; Jullian, N.; Rocquigny, H.De.; Maigret, B.; Darlix, J.L.; Roques, B.P. (1992) Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR. *The EMBO Journal* 11(8):3059-3065
- Morita, E.; Sandrin, V.; Chung, H.Y.; Morham, S.G.; Gygi, S.P.; Rodesch, C.K.; Sundquist, W.I. (2007) Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO Journal* 26(19): 4215-4227

- Morrow, I.C. and Parton, R.G. (2005) Flotillins and the PHB Domain Protein Family: Rafts, Worms and Anaesthetics. *Traffic* 6(9): 725-740
- Morrow, I.C.; Rea, S.; Martin, S.; Prior, I.A.; Prohaska, R.; Hancock, J.F.; James, D.E.; 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. *Journal of Biological Chemistry* 277(50):48834-48841
- Neumann-Giesen, C.; Falkenbach, B.; Beicht, P.; Claasen, S.; Lüers, G.; Stuermer, C.A.O.; 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. *Biochemical Journal* 378(Pt 2) :509-518
- Neumann-Giesen, C.; Fernow, I.; Amadii, M.; Tikkanen, R. (2007) Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 120(3):395-406
- Nguyen, D.H. and Hildreth, J.E. (2000) Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *Journal of Virology* 74(7):3264-3272
- Phuyal, S.; Hessvik, N.P.; Skotland, T.; Sandvig, K.; Llorente, A. (2014) Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *The FEBS Journal* 281(9):2214-2227
- Pike, L.J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochemical Journal* 378(Pt 2): 281-292
- Pust, S.; Dyve, A.B.; Torgersen, M.L.; Deurs, B.V.; Sandvig, K. (2010) Interplay between Toxin Transport and Flotillin Localization. *PLOS ONE* 5(1):e8844
- Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R. (2008) Duale Reihe Biochemie. 2.Auflage. *Georg Thieme Verlag* p.710-719
- Redpath, G.M.I.; Ecker, M.; Kapoor-Kaushik, N.; Vartoukian, H.; Carnell, M.; Kempe, D.; Biro, M.; Ariotti, N.; Rossy, J. (2019) Flotillins promote T cell receptor sorting through a fast Rab5-Rab11 endocytic recycling axis. *Nature Communications* 10(1):4392

- Riento, K.; Frick, M.; Schafer, I.; Nichols, B.J. (2009) Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *Journal of Cell Science* 122(7):912-918
- Rocquigny, H.De.; Gabus, C.; Vincent, A.; Fournié-Zaluski, M.C.; Roques, B.; Darlix, J.L. (1992) Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *PNAS USA* 89(14):6472-6476
- Scarlata, S. and Carter, C. (2003) Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1614 (1): 62-72
- Schulte, T.; Paschke, K.A.; Laessing, U.; Lottspeich, F.; Stuermer, C.A. (1997) Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development* 124(2):577-587
- Simons, K. and Sampaio, J.L. (2011) Membrane Organisation and Lipid Rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(10):a004697
- Solis, G.P.; Hoegg, M.; Munderloh, C.; Schrock, Y.; Malaga-Trillo, E.; Rivera-Miller, E.; Stuermer, C.A.O. (2007) Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochemical Journal* 403(Pt 2):313-322
- Spearman, P. (2016) HIV-1 Gag as an Antiviral Target: Development of Assembly and Maturation Inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry* 16(10): 1154-1166
- Suzuki, T. and Suzuki, Y. (2006) Virus Infection and Lipid Rafts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29(8):1538-1541
- VerPlank, L.; Bouamr, F.; LaGrassa, T.J.; Agresta, B.; Kikonyogo, A.; Leis, J.; Carter, C.A. (2001) Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55^{Gag}. *PNAS USA* 98(14):7724-7729
- Waheed, A.A. and Freed, E.O. (2009) Lipids and Membrane Microdomains in HIV-1 Replication. *Virus research* 143(2):162-176
- Waheed, A.A. and Freed, E.O. (2012) HIV Type 1 Gag as a Target for Antiviral Therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses* 28(1):54-75
- Weiss, R.A. (2000) Getting to know HIV. *Tropical Medicine & International Health* 5 (7): A10-A15

Whittle, H.; Morris, J.; Todd, J.; Corrah, T.; Sabally, S.; Bangali, J.; Ngom, P.T.; Rolfe, M.; Wilkins, A. (1994) HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients. *AIDS* 8(11): 1617-1620

Zhou, W.; Parent, L.J.; Wills, J.W.; Resh, M.D. (1994) Identification of a Membrane-Binding Domain with the Amino-Terminal Region of Human Immunodeficiency Virus Type1 Gag Protein Wich Interacts with Acidic Phospholipids. *Journal of Virology* 68(4):2556-2569

9. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

10. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die mich stets sowohl im Labor als auch während der Zeit des Schreibens unterstützt, aufgebaut und motiviert haben.

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Ritva Tikkanen bedanken. Sie war stets für meine Anliegen da und zeigte ein sehr großes Engagement mit einer fürsorglichen Betreuung. Es hat mir eine sehr große Freude bereitet, die Doktorarbeit bei ihr anfertigen zu dürfen.

Als nächstes möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Tikkanen bedanken. Ich wurde sofort wohlbehütet aufgenommen und es waren alle stets hilfsbereit. Mit der großartigen Stimmung und tollen Harmonie im Team wurde mir die Arbeit während der Laborzeit stets schmackhaft versüßt. Ich bin allen in der Arbeitsgruppe Tikkanen dankbar, dass ich diese neuen Freundschaften knüpfen durfte.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie und meiner großen Liebe Elena danken. Die Zeit während der Doktorarbeit war nicht immer einfach. Es gab auch Momente, in denen man einknickte oder müde war. Ihr habt alle stets an mich geglaubt und mich mit euren unterstützenden Worten aufgebaut und motiviert. Ohne euch wäre die Fertigstellung der Doktorarbeit nicht möglich gewesen.