



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 101 30 155 B3** 2004.03.04

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **101 30 155.3**

(22) Anmeldetag: **22.06.2001**

(43) Offenlegungstag: –

(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **04.03.2004**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/85**  
**C12Q 1/68**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(71) Patentinhaber:

**GSF-Forschungszentrum für Umwelt und  
Gesundheit GmbH, 85764 Oberschleißheim, DE**

(74) Vertreter:

**PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR,  
80801 München**

(72) Erfinder:

**Neumann, Markus, 85716 Unterschleißheim, DE;  
Brack-Werner, Ruth, 80999 München, DE; Wolff,  
Horst, 81677 München, DE; Erfle, Volker, 81679  
München, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

**US 62 25 045 B1**

**US 56 54 398**

**WO 99 64 625 A2**

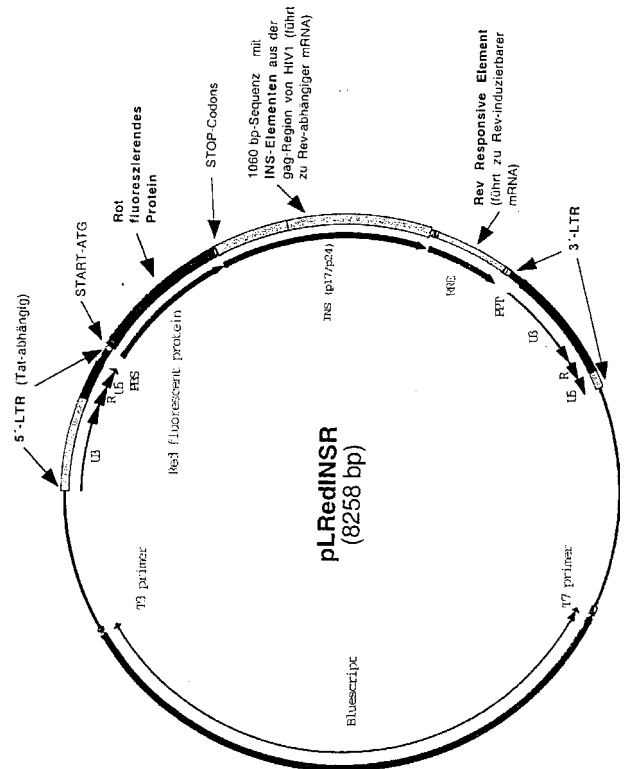
**WO 99 39 011 A1**

**WO 98 44 147 A1**

**WO 97 09 342 A1**

(54) Bezeichnung: **Reporter-gen-Konstrukt zum Nachweis von HIV-Rev und HIV-Tat**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Reporter-gen-Konstrukt zum Nachweis der HIV-Rev- und HIV-Tat-Proteine. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Funktionalitäts-Testverfahren für rekombinant hergestellte Rev und Rev-Fusionsproteine, ein Screeningverfahren für Sequenzen unterschiedlicher Herkunft nach ihrer Wirkung als Instabilitäts-Element, ein Screeningverfahren für Sequenzen, die durch Bindung an zelluläre oder andere virale Shuttle-Proteine den Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma bewirken, sowie ein Verfahren zum Nachweis HIV-infizierter Zellen. Das erfindungsgemäße Reporter-gen-Konstrukt führt nach Einschleusung in Zellen, bei Vorliegen der HIV-Rev- und HIV-Tat-Proteine, zur Bildung von Reporterproteinen, die zum quantitativen/qualitativen Nachweis der HIV-Rev- und HIV-Tat-Proteine dienen.



**Beschreibung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Reporter-Gen-Konstrukt zum Nachweis der HIV-Rev und HIV-Tat-Proteine. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Funktionalitäts-Testverfahren für rekombinant hergestellte Rev und Rev-Fusionsproteine, ein Screeningverfahren für Sequenzen unterschiedlicher Herkunft nach ihrer Wirkung als Instabilitäts-Element, ein Screeningverfahren für Sequenzen, die durch Bindung an zelluläre oder andere virale Shuttle-Proteine den Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma bewirken, sowie ein Verfahren zum Nachweis HIV-infizierter Zellen.

**Stand der Technik**

[0002] Rev und Tat sind Regulationsfaktoren des humanen Immundefizienzvirus (HIV). Sie sind unter den ersten HIV-Proteinen, die in infizierten Zellen synthetisiert werden und sind beide Stimulatoren der HIV-Genexpression. Die biologische Aktivität von Tat und Rev ist entscheidend für das Maß der Virusproduktion durch infizierte Zellen. Beispielsweise geht die für humane Astrozyten charakteristische niedrige HIV-Produktion mit einer 10-fach verminderten Aktivität von HIV-Rev einher (Ludwig et al., 1999, J.Virol. 73:8279-8289).

[0003] Diese oben genannte Bedeutung von Rev und Tat für das Maß der Virusproduktion macht sie für Verfahren zum Nachweis einer HIV-Infektion besonders geeignet.

[0004] Gegenwärtig gibt es zwei Typen von Rev-Reportersystemen, die entweder (1) HIV-Gag Proteine (z.B. Vektor pBR37R (Ludwig et al., 1999, J.Virol. 73:8279-8289)) oder (2) ein heterologes Protein (z.B. Chloramphenicolacetyl-transferase = CAT; pDM128 Hope T.J. et al., 1990) als Reporter für die Rev-Aktivität verwenden. In beiden Systemen wird das Rev-Reporterprotein indirekt nachgewiesen, d.h. entweder mit Hilfe von Antikörper-ELISA (Gag, CAT) oder bei pDM128 durch einen CAT-Funktionstest. Beide Reporterproteine werden in Lysaten von transfizierten Zellen nachgewiesen, wobei mehrere tausend transfizierte Zellen eingesetzt werden müssen.

[0005] Hauptnachteile beispielsweise des "gag-ELISA" sind der relativ große Zeit- und Material-Aufwand, die Notwendigkeit zur Lyse der Zellen (keine Weiterverwendung der Zellpopulation möglich) und der hohe Preis (die bisherigen Techniken basieren auf der Ermittlung der Rev-Aktivität im sogenannten "batch"-Verfahren (Antigennachweis im Extrakt lysierter Zellen)).

[0006] Es hat bisher auch Ansätze gegeben, die alleine das oben genannte HIV-Tat Protein nachweisen. Für diesen Nachweis wurden Reporter-Konstrukte eingesetzt, die beispielsweise grün fluoreszierendes Protein unter der Kontrolle der HIV-LTR exprimieren und somit Tat-abhängig (aber Rev-unabhängig) sind (s. Dorsky et al., J Acquir Immune Defic

Syndr Hum Retrovirol 1996 Dec 1;13(4):308-313 Detection of HIV-1 infection with a green fluorescent protein reporter system).

**Aufgabenstellung**

[0007] Es ist in Anbetracht der oben genannten Nachteile daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein hochspezifisches Reporter-Gen-Konstrukt bereitzustellen, mit dem HIV-Rev und -Tat spezifische Testverfahren mit lebenden Zellen auf Einzelzellebene, schnell und kostengünstig durchgeführt werden können.

[0008] Diese Aufgabe wird durch die in den unabhängigen Patentansprüchen angegebenen Merkmale gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den Unteransprüchen dargelegt.

[0009] Die Erfindung ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung der Funktion der HIV-Rev- und Tat-Proteine in lebenden, eukaryotischen Zellen auf Einzelzellebene.

[0010] Der Test basiert darauf, Zellen, die Rev enthalten, durch die Expression eines Reporterproteins qualitativ und quantitativ zu erfassen und eventuell zu sortieren und weiterzukultivieren. Um diese Rev-abhängige Expression des fluoreszierenden Proteins zu erreichen wird ein Reporter-Plasmid verwendet, das in die zu testenden Zellen gebracht wird.

[0011] Dieses Reporter-Plasmid weist die folgenden Elemente in funktioneller Verbindung auf

- a) einen Promotor,
- b) ein TAR (Tat-activation-response)-Element,
- c) ein Reporter-Gen,
- d) das HIV-Rev-responsive Element (RRE),
- e) ein Terminationssignal für die Transkription und ein poly-Adenylierungssignal.

[0012] Vorteil des neu entwickelten Reporter-Konstrukts ist die unkomplizierte und kostengünstige Anwendung (lediglich ein Plasmid wird benötigt), die es erlaubt eine nahezu beliebig große Zahl von Zellen einem Screening zu unterziehen. Ein weiterer Vorteil ist die Tatsache, daß Einzelzellanalysen vorgenommen werden können. Dies ist insbesondere zum diagnostischen Nachweis geringer Mengen infizierter Zellen in Patienten mit HIV-Infektion wichtig. Methode der Wahl ist hierbei die Durchfluß-Fluoreszenz-Zytometrie, die es überdies noch erlaubt, ausgewählte Zellen zu sortieren und weiterzukultivieren.

[0013] Die Erfindung ermöglicht zum ersten Mal die Messung der Rev-Aktivität in lebendigen Zellen auf Einzelzellebene schnell und kostengünstig.

[0014] Das vorliegende Reporter- Konstrukt enthält alle HIV-Elemente, die eine Expressionsabhängigkeit von Tat und Rev bewirken, in Verbindung mit einem heterologen Reporter. Damit wird eine sehr hohe Spezifität für die Aktivität dieser HIV Faktoren erreicht. Im Gegensatz zu den bisherigen Rev-Reporter Systemen (s.oben), wird ein Reporter-Protein verwendet, das entweder selbst oder durch Bildung ent-

sprechender nichttoxischer Produkte in lebenden Zellen nachweisbar ist und so den direkten Nachweis des Reporters ermöglicht. Zu diesen Reporter-Proteinen zählen beispielsweise fluoreszierende Proteine (z.B. mit roter, gelber oder blauer Fluoreszenz), oder Enzyme, die einen zellulären Farbstoff umsetzen, kurz alle Proteine, die sich ohne Zellfixation auf Einzelzellebene über nichttoxische Produkte nachweisen lassen. Die Verwendung derartiger Reporterproteine trägt ebenfalls zur Erhöhung der Spezifität bei und ermöglicht eine raschere und kostengünstigere Durchführung des Test.

[0015] Der Begriff „Promotor“, wie er in den Patentsprüchen und in der Beschreibung verwendet wird, soll alle Transkriptionssteuereinheiten einschließen, wie z.B. Enhancer.

[0016] Das erfindungsgemäße Reporter-Gen-Konstrukt enthält vorzugsweise Instabilitätselemente (INS). Diese Instabilitätselemente, vorzugsweise aus der HIV-RNA, inhibieren die Expression in Abwesenheit von Rev. Durch die Inkorporation dieser INS in das Konstrukt nach dem Reporter wird für eine maximale Inhibition der Expression des Reporters ohne Vorhandensein von Rev gesorgt, ohne die Translation des Reporters in Anwesenheit von Rev zu beeinflussen. Damit weist das Reportersystem durch die Anwesenheit von INS einen extrem geringen „background“ ohne Rev auf. Eine ausführliche Beschreibung der INS findet sich in der Publikation von Schneider R. et al., Journal of Virology, July 1997, Seiten 4892-4903, auf die hier vollinhaltlich Bezug genommen wird.

[0017] Das INS ist im Reporter-Konstrukt nach der Reportergensequenz angeordnet. Falls eine Terminationssequenz für die Proteinsynthese (siehe unten) in direktem Anschluß an die Reportergensequenz in dem Konstrukt enthalten ist, ist das INS zwischen dieser Terminationssequenz und dem HIV-Rev-responsiven Element (RRE) angeordnet (siehe auch **Abb. 3**). Erfindungsgemäß können ein oder mehrere INS im Konstrukt enthalten sein. Durch wiederholte Einfügung von INS-Sequenzen kann der oben beschriebene „Background“ noch weiter minimiert werden (siehe hierzu auch **Abb. 3**).

[0018] Das Reporter-Gen-Konstrukt enthält weiterhin vorzugsweise nach der Reportergensequenz ein Terminationssignal für die Proteinsynthese.

[0019] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform stammt das Instabilitätselement aus dem HIV-Genom, z.B. den INS-Bereichen der gag-Region von HIV und kann beispielsweise aus den Basen Nr. 379-1424 des HIV-HXB2R-Genoms bestehen. Die Sequenz ist veröffentlicht in Ratner et al., Nature 313(6000): 277-284 (1985).

[0020] Das erfindungsgemäße Reporter-Konstrukt findet in einem Verfahren zum in vitro-Nachweis von HIV-infizierten eukaryotischen Zellen Verwendung. Bei diesem Verfahren wird das erfindungsgemäße Reporter-Gen-Konstrukt in die Zellen eingeschleust, die Zellen nach einer definierten Zeitspanne geerntet,

und zuletzt wird eine Bestimmung des Vorhandenseins/der Menge des Reporterproteins erfolgen. Als definierte Zeitspanne hat sich eine Zeitspanne von ungefähr 24h als besonders vorteilhaft erwiesen. [0021] Vorzugsweise codiert das Reporter-Gen-Konstrukt ein fluoreszierendes Protein, wobei die Bestimmung des Proteins durch Fluoreszenzmikroskopie oder mit FACS erfolgt.

[0022] Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin ein Screeningverfahren für Gensequenzen nach ihrer Wirkung als Instabilitätselement bereit. Bei diesem Verfahren wird das Instabilitätselement des Reporter-Gen-Konstruktes durch eine Testsequenz ersetzt, Zellen mit diesem Reporter-Gen-Konstrukt transfiziert, und zuletzt die Expression des Reporters mit der Expression des ursprünglichen Reporter-Gen-Konstruktes in Anwesenheit von Tat und Rev verglichen. [0023] Weiterhin stellt die vorliegende Erfindung ein Screeningverfahren für Gensequenzen bereit, die durch Bindung an zelluläre oder andere virale Shuttle-Proteine den Transport aus dem Zellkern bewirken, bei dem das Rev-responsive Element des erfindungsgemäßen Reporter-Gen-Konstruktes durch eine Testsequenz ersetzt wird, wonach Zellen mit diesem Reporter-Gen-Konstrukt transfiziert werden und die Expression des Reporters mit der Expression des ursprünglichen Reporter-Gen-Konstruktes in Anwesenheit von Tat und Rev verglichen wird.

[0024] Weiterhin wird ein Expressionsvektor bereitgestellt, der ein erfindungsgemäßes Reporter-Gen-Konstrukt enthält, eine eukaryotische oder prokaryotische Zelle, die mit diesem Expressionsvektor transformiert worden ist, sowie RNA, die durch Transkription eines der erfindungsgemäßen Expressionsvektoren erzeugt wird.

[0025] Zuletzt umfasst die vorliegende Erfindung einen Funktionalitäts-Test für rekombinant hergestelltes Rev und Rev-Fusionsproteine, bei dem Zellen mit einem erfindungsgemäßen Reporter-Gen-Konstrukt transfiziert werden, wobei die Zellen mit einem Tat-Expressionsplasmid kotransfiziert werden, oder der Test in einer Zelllinie durchgeführt wird, die stabil Tat exprimiert.

[0026] Beschreibung der Zeichnungen:

[0027] **Abb. 1** zeigt ein erfindungsgemäßes Reporter-Konstrukt.

[0028] **Abb. 2** zeigt das Schema der fluorimetrischen Detektion der Expression der frühen HIV-Proteine Rev und Tat auf Einzelzell-Ebene.

[0029] **Abb. 3** zeigt die Plasmide pLRed, pLRedR, pLRedINSR und pLRed2xINSR im Vergleich.

[0030] **Abb. 4** zeigt die Rev-abhängige Expression des Reporters am Beispiel von pLRedINSR und pLRed2xINSR.

[0031] In **Abb. 1** ist anhand einer Ausführungsform ein erfindungsgemäßes Reporter-Konstrukt dargestellt, das neben einem Reporter-Gen das RNA-Bindungselement für Rev (genannt RRE = Rev Responsive Element), und HIV-RNA-Elemente (sog. Instabilitätselemente = INS) enthält, die die Expression in Ab-

wesenheit von Rev inhibieren. Durch die Inkorporation dieser INS in das erfindungsgemäße System nach dem Terminationssignal für den Reporter wird für eine maximale Inhibition der Expression des Reporters ohne Vorhandensein von Rev gesorgt, ohne die Translation des Reporters in Anwesenheit von Rev zu beeinflussen.

[0032] In der vorliegenden Ausführungsform wurde ein Teil des HIV-gag Gens, in dem bereits mehrere INS identifiziert wurden (Schneider et al., 1997) eingesetzt. Im erfindungsgemäßen Reporterkonstrukt befinden sich die INS ausserhalb der fuer den Reporter kodierenden Bereiche, und können somit nicht die Synthese des Reporters auf Translationsebene beeinflussen.

[0033] Das in **Abb. 1** dargestellte Reporter-Konstrukt besteht aus folgenden Elementen:

5-LTR: enthält die Transkriptionssteuereinheit (Promotor/Enhancer) und 3' der mRNA-Startstelle die TAR (Tat-activation-response element) an die das HIV-Protein Tat bindet. Tat wird für eine effektive Elongation der mRNA-Transkripte benötigt

Red: Rot fluoreszierendes Protein (hier: DsRed von Clontech; jede andere Variante eines fluoreszierenden Proteins ist denkbar, allerdings empfehlen sich bestimmte Varianten (grün, rot) für spätere FACS-Analysen). Nach der Gen-Sequenz für das rot fluoreszierende Protein befinden sich STOP-Codons (Terminationssignale), so daß eine Translation in jedem Fall hier endet und als exprimiertes Protein im Assay nur DsRed auftaucht (S1). Das Gen wurde aus dem von CLONTECH kommerziell erhältlichen Vektor pDsRed1-N1 amplifiziert.

P17/24: 1060 bp Region aus dem gag-Bereich von HIV (Base Nr 379-1424 des HXB2R-Genoms). Die darin enthaltenen sogenannten INS-Bereiche sorgen in Abwesenheit von Rev für Instabilität der mRNA, d.h. verhindern einen effektiven Transport der mRNA ins Zytoplasma durch die zelluläre Maschinerie.

[0034] RRE: Rev-Responsive Element, Enthält die Bindestelle für das virale Shuttle-Protein Rev, das hierdurch die Möglichkeit erhält die mRNA ins Zytoplasma zu transportieren und vor dem Abbau im Zellkern zu bewahren.

3'-LTR: Transkriptionsende und poly-Adenylierungssignal für die mRNA Wie in **Abb. 2** dargestellt ist, werden mit dem erfindungsgemäßen Reporter-Konstrukt Zellen transfiziert, mikroinjiziert o.ä. und diese nach einem definierten Zeitpunkt geerntet und analysiert. Der Zeitpunkt ist abhängig von der Menge des transfizierten Plasmids, dem Zelltyp und der Menge der Proteine Tat und Rev in den zu untersuchenden Zellen.

[0035] Für typische Zellkultur-Experimente ist eine Zeitspanne von 24 h ideal.

[0036] Da die Anwesenheit von Tat in der Zelle notwendig ist, um eine effektive Transkriptionselongation zu ermöglichen, werden nur in Zellen die funktionales Tat enthalten, nennenswerte Mengen der Reporter-mRNA gebildet.

[0037] Funktional aktives Rev wird im weiteren Verlauf benötigt um die Reporter-mRNA ins Zytoplasma zu transportieren, da sie sonst aufgrund der auf der mRNA enthaltenen Instabilitätselemente im Zellkern verbleiben und abgebaut würden. Nur im Fall eines effektiven Transports der mRNA ins Zytoplasma wird die Translation des rot fluoreszierenden Proteins gestartet.

[0038] Erst wenn die beiden Proteine Rev und Tat in funktioneller Form (dies ist z.B. bei einer Transfektion entsprechender Expressionsplasmide, Mikroinjektion oder Transfektion funktionaler Proteine der Fall) in der Zelle vorliegen, findet eine starke Expression fluoreszierenden Proteins statt. Diese Fluoreszenz kann schnell und unkompliziert auf Einzellzebene im Fluoreszenz-Mikroskop oder mit dem FACS beobachtet und dokumentiert werden.

#### Ausführungsbeispiel

##### Beispiel:

[0039] In einem Experiment wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Kombinationen der beschriebenen Plasmide transfiziert und auf die Expression der fluoreszierenden Proteine untersucht.

[0040] HeLa Zellen wurden mit den beschriebenen Konstrukten transfiziert und in der FACS-Analyse untersucht:

##### FACS-Analyse:

[0041] Für die Analyse der Tat- und Rev-abhängigen Expression der fluoreszierenden Reporter wurden HeLa und HeLa-Tat Zellen verwendet.

[0042] Es wurden Zellen in 60 mm Kulturschalen ausgesät und nach 24 h mit den Reporter-Konstrukten und einer Transfektionskontrolle (GFP), bzw. mit den Reporter-Konstrukten und einem Expressionskonstrukt für ein Rev-GFP-Fusionsprotein mit verschiedenen Methoden transfiziert. Dafür wurden die Methode der Kalziumphosphat-Kopräzipitation (Cell Pfect, Amersham Pharmacia) und FuGene (Roche) verwendet. Die Ergebnisse waren dabei nicht abhängig von der verwendeten Methode.

[0043] 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, in PBS aufgenommen und anschliessend einer FACS-Analyse unterzogen (FACS-Plots: siehe Abbildung F1 und F2). Die Analysen wurden mit einem FACSCalibur-Gerät und der Software CellQuest der Firma Becton Dickinson durchgeführt.

[0044] Zur Auswertung wurden zwischen 20.000 und 100.000 Zellen einer gesunden, homogenen Zellpopulation auf ihre Fluoreszenz untersucht. Hierfür wurden in einem 2D-Plot die grüne Fluoreszenz der Transfektionskontrolle bzw des Rev-GFP-Fusionsproteins gegen die rote Fluoreszenz des Reporter-Proteins aufgetragen. Zur Auswertung wurde untersucht wieviele grün fluoreszierende Zellen eine

starke rote Fluoreszenz aufwiesen. Wiederholte Versuche zeigten dass die Expression des Reporters stark (pLRedINSR) bzw ausserordentlich stark (pLRed(2xINS)R) von der Anwesenheit von Rev abhängig ist. Im Falle des Reporters pLRed(2xINS)R konnte bei den durchgeführten Experimenten kein unspezifischer Hintergrund beobachtet werden.

[0045] Die Anwesenheit von Tat ist eine Grundvoraussetzung für diese Experimente, wie ebenso gezeigt werden konnte.

### Patentansprüche

1. Reporter-gen-Konstrukt, das Folgendes in funktioneller Verbindung enthält:

- a) einen Promotor,
- b) ein TAR (Tat-activation-response)-Element,
- c) ein Reporter-gen,
- d) das HIV-Rev-responsive Element (RRE),
- e) ein Terminationssignal für die Transkription und ein poly-Adenylierungssignal.

2. Reporter-gen-Konstrukt nach Anspruch 1, das nach der Reporter-gensequenz ein Terminationssignal für die Proteinsynthese enthält.

3. Reporter-gen-Konstrukt nach Anspruch 1 oder 2, das nach der Reporter-gensequenz, bzw. falls vorhanden, nach dem Terminationssignal für die Proteinsynthese, ein oder mehrere Instabilitätselemente (INS) enthält.

4. Reporter-gen-Konstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Reporter-gen ein fluoreszierendes Protein codiert.

5. Reporter-gen-Konstrukt nach Anspruch 4, bei dem das Reporter-gen ein rot fluoreszierendes Protein codiert.

6. Reporter-gen-Konstrukt nach einem oder mehreren Ansprüche 3-5, bei dem das Instabilitätselement aus einem HIV-Genom abstammt.

7. Reporter-gen-Konstrukt nach Anspruch 6, bei dem das Instabilitätselement aus den INS- Bereichen der gag-Region von HIV besteht.

8. Reporter-gen-Konstrukt nach Anspruch 7, bei dem das Instabilitätselement aus den Basen Nr. 379-1424 des HIV-HXB2R-Genoms besteht.

9. Verfahren zum in vitro-Nachweis von HIV=infizierten eukaryotischen Zellen, bei dem

- a) In die Zellen ein Reporter-gen-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-8 eingeschleust wird,
- b) die Zellen nach einer definierten Zeitspanne geerntet werden, und
- c) eine Bestimmung des Vorhandenseins/der Menge des Reporterproteins erfolgt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem das Reporter-gen-Konstrukt ein fluoreszierendes Protein codiert, wobei die Bestimmung des Proteins durch Fluoreszenzmikroskopie oder mit FACS erfolgt.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, bei dem die definierte Zeitspanne 24h beträgt.

12. Screeningverfahren für Gensequenzen nach ihrer Wirkung als Instabilitätselement, bei dem

- a) das Instabilitätselement des Reporter-gen-Konstruktes nach Anspruch 3-8 durch eine Testsequenz ersetzt wird
- b) dieses Test-Reporter-gen-Konstrukt in Zellen eingeschleust wird,
- c) die Expression des Reporters des Test-Reporter-gen-Konstruktes mit der des Reporter-gen-Konstruktes nach Anspruch 1-8 in Anwesenheit von Tat und Rev verglichen wird.

13. Screeningverfahren für Gensequenzen, die durch Bindung an zelluläre oder andere virale Shuttle-Proteine den Transport aus dem Zellkern bewirken, bei dem

- a) das Rev-responsive Element des Reporter-gen-Konstruktes nach Anspruch 1-8 durch eine Testsequenz ersetzt wird
- b) dieses Test-Reporter-gen-Konstrukt in Zellen eingeschleust wird,
- c) die Expression des Reporters des Test-Reporter-gen-Konstruktes mit der des Reporter-gen-Konstruktes nach Anspruch 1-8 in Anwesenheit von Tat und Rev verglichen wird.

14. Expressionsvektor, der ein Reporter-genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1-8 enthält.

15. Eukaryotische oder prokaryotische Zelle, die mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 14 transformiert worden ist, ausgenommen humane embryonale Stammzellen.

16. RNA, die durch Transkription eines der Reporter-gen-Konstrukte nach Anspruch 1-8 erzeugt wird.

17. Funktionalitäts-Test für rekombinant hergestelltes Rev und Rev-Fusionsproteine, bei dem

- a) in Zellen ein Reporter-gen-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-8 eingeschleust wird, wobei
- b) die Zellen mit einem Tat-Expressionsplasmid kointransfiziert werden, oder
- c) der Test in einer Zelllinie durchgeführt wird, die stabil Tat exprimiert, oder
- d) der Test in Anwesenheit von rekombinantem Tat-Protein durchgeführt wird, und darauf
- e) die Zellen nach einer definierten Zeitspanne geerntet werden, und
- f) eine Bestimmung des Vorhandenseins/der Menge

des Reporterproteins erfolgt.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1: Reporter-Konstrukt

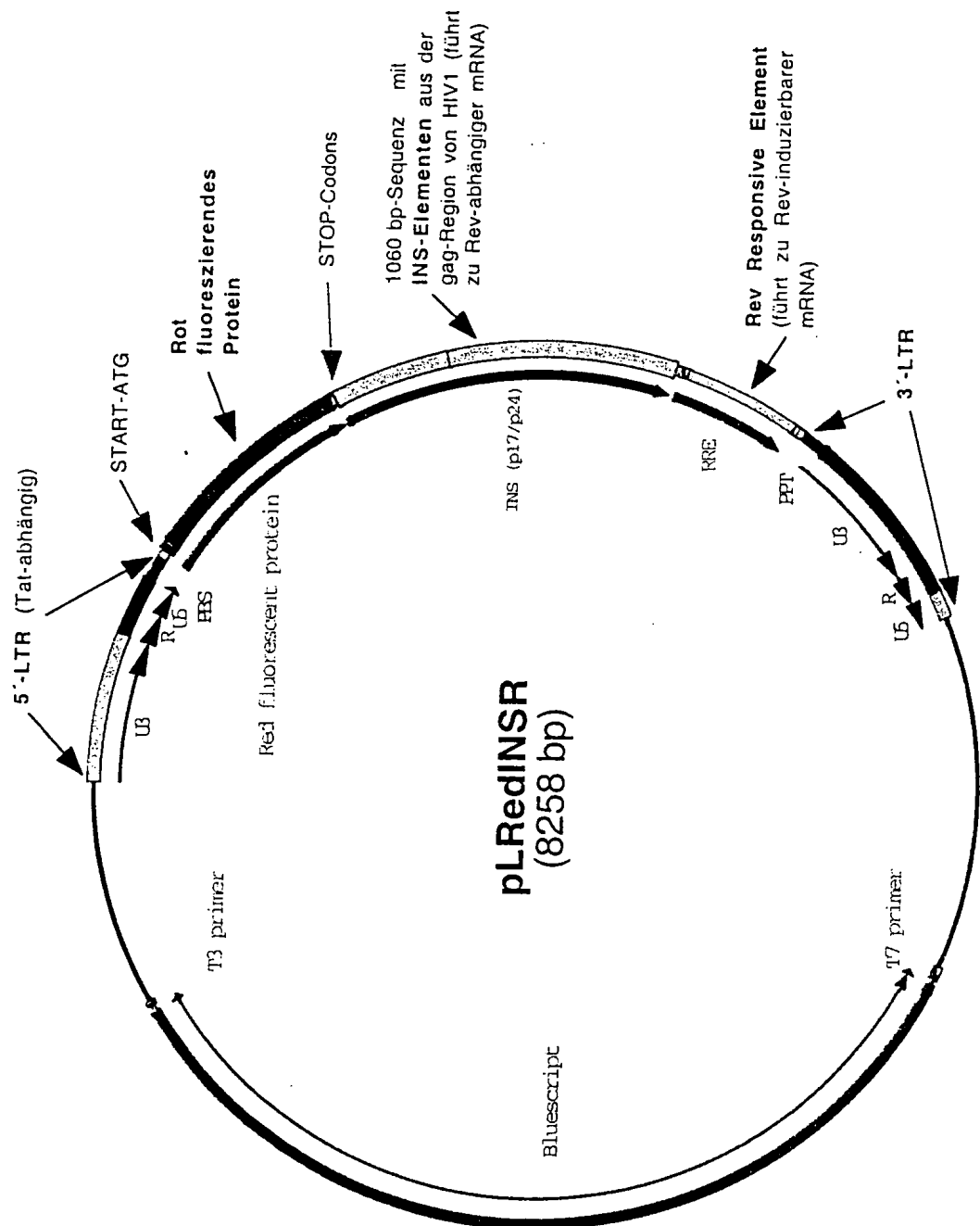
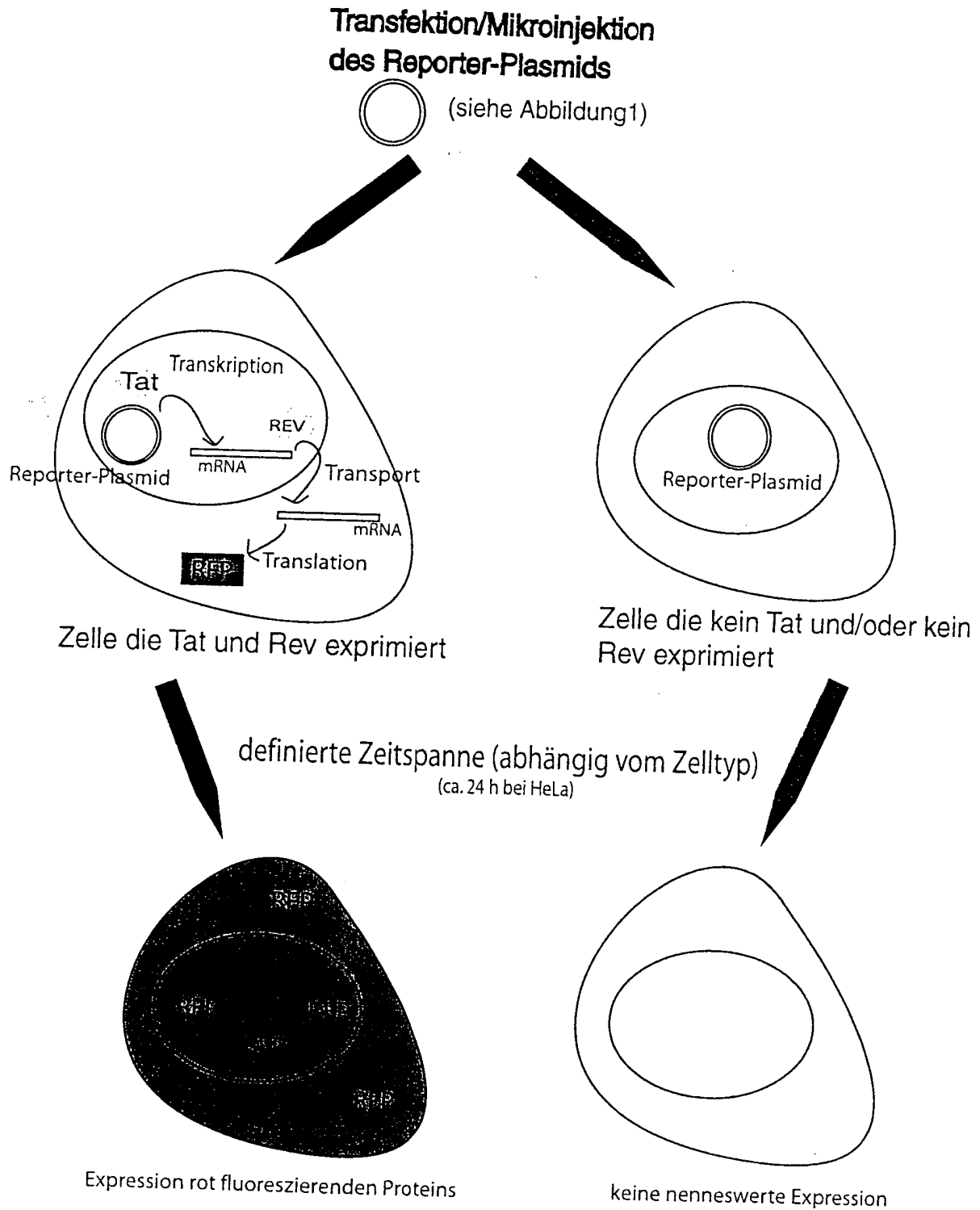


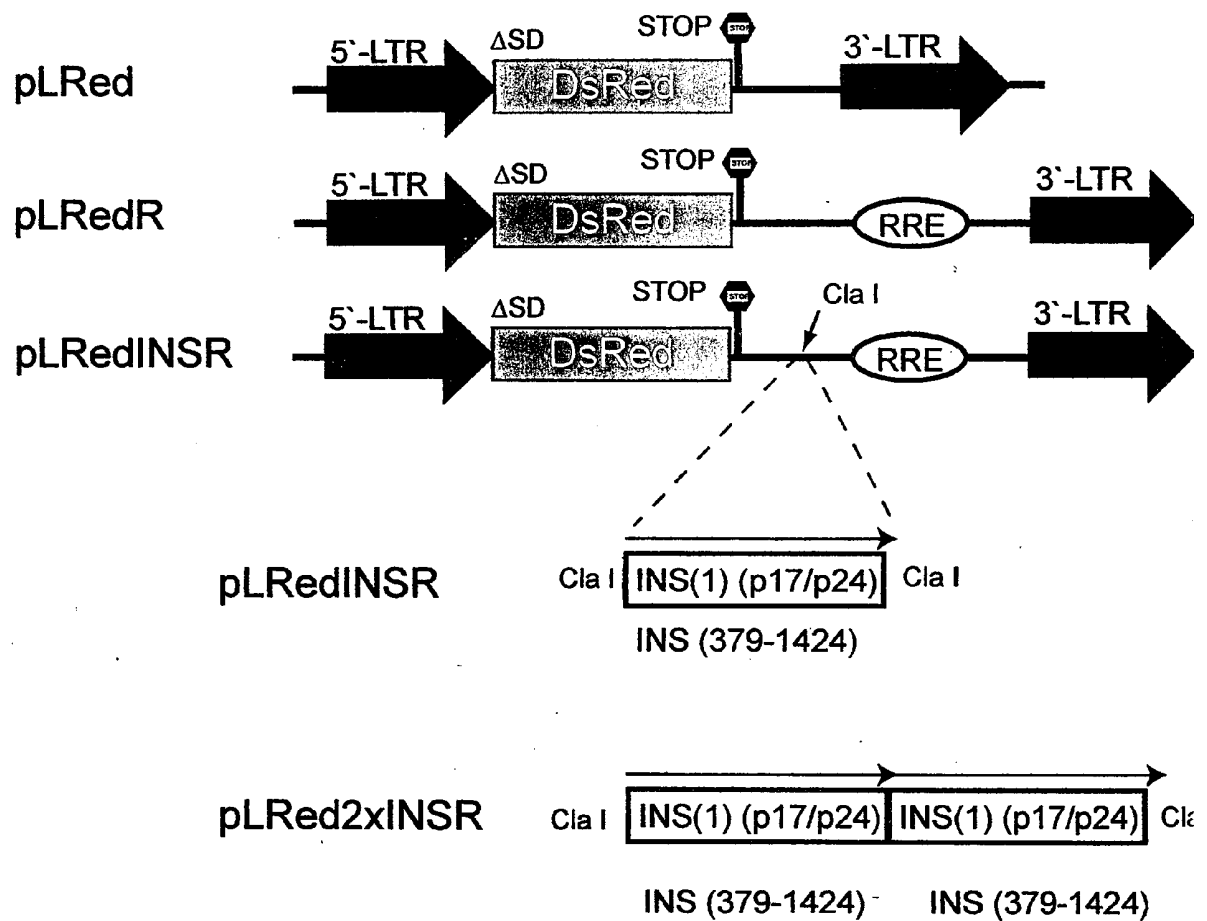
Abbildung 2: Fluorimetrische Detektion der Expression der frühen HIV-Proteine Rev und Tat auf Einzelzell-Ebene



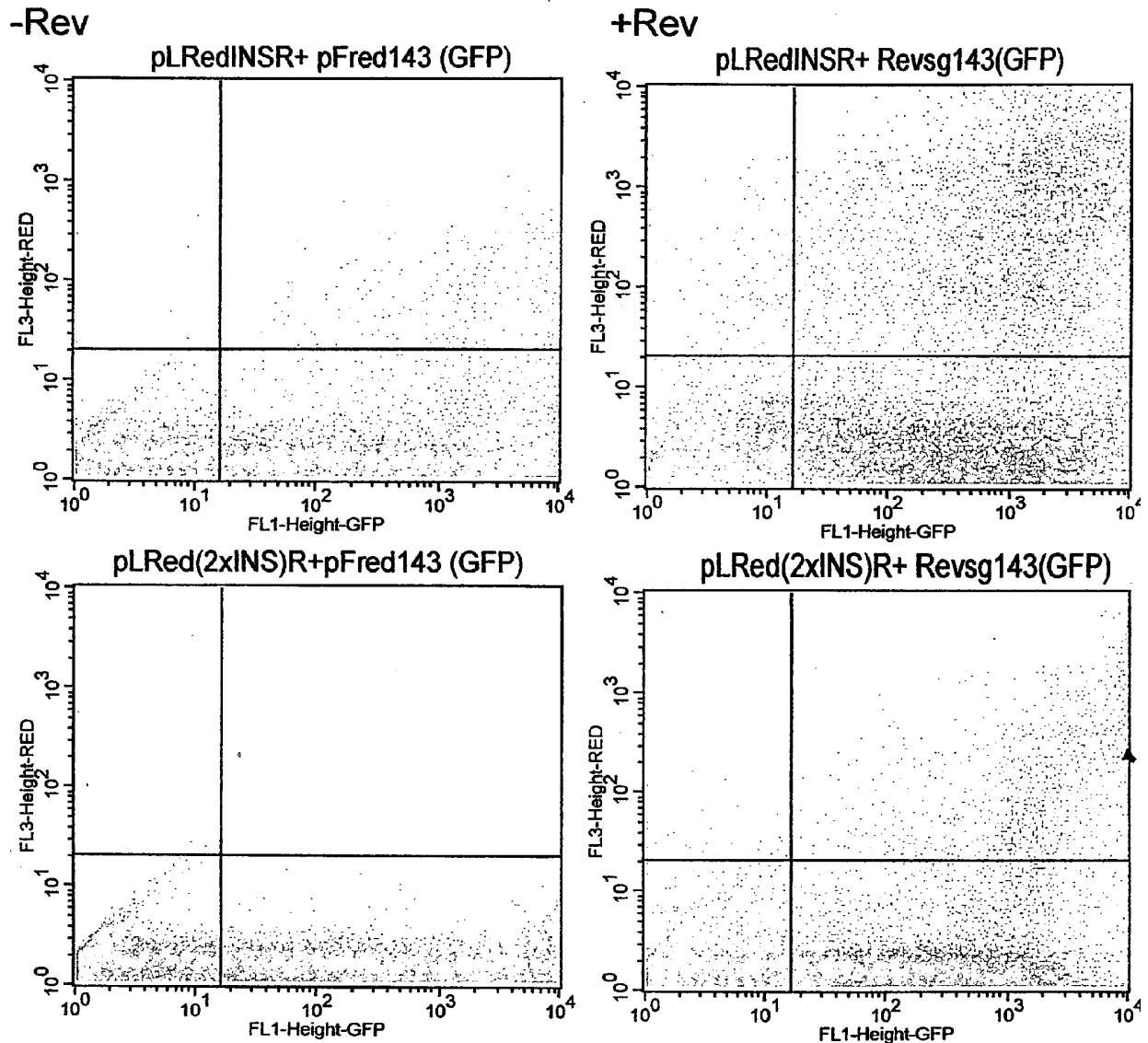
Detektion und Quantifizierung durch  
Fluoreszenz-Mikroskopie, FACS-Analyse, Spektrometrie usw.



Figur 1 (Plasmide)



## Rev-abhaengige Expression des Reporters (alle Experimente in HeLa-Tat- Zellen)



**AbbF2:** Darstellung der Rev-Abhaengigkeit zweier Reporter-Konstrukts mittels FACS-Analyse.

HeLa-Tat Zellen wurden mit einem Reporter-Konstrukt (obere FACS-Plots: pLRedINSR, untere FACS-Plots: pLRed(2xINS)R) und jeweils einer gruen fluoreszierenden Transfektionskontrolle (linke Plots) und einem gruen fluoreszierenden Rev-Fusionsprotein transfiziert (rechte Plots).

Zellen die stark positiv fuer eine Expression des rot fluoreszierenden Reporters sind, sind im rechten oberen Quadranten weit oben lokalisiert. Zellen die transfiziert wurde und nur fuer die konstitutiv exprimierte Transfektionskontrolle positiv sind, befinden sich im rechten unteren Quadranten. Zellen die nicht transfiziert wurden liegen im linken unteren Quadranten. Deutlich festzustellen ist, dass bei Anwesenheit von Rev wesentlich mehr von dem Reporter-Protein exprimiert wird und dass sich die beiden Konstrukte in ihrer Rev-Abhaengigkeit unterscheiden (das untere Konstrukt ist deutlich staerker Rev-abhaengig).