

2 MATERIAL

2.1 Puffer

PBS-Puffer:	140 mM NaCl; 25 mM KCl; 0,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; 10 mM Na/K-PO ₄ ; pH 7,5
Uppergelstock:	0,5 M Tris/HCl; 0,4% Natriumdodecylsulfat (SDS); pH 6,8
Bottomgelstock:	1,5 M Tris/HCl; 20% Natriumdodecylsulfat (SDS); pH 8,8
SDS-Laufpuffer:	200 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,05% SDS, pH 8,2
SDS-Transferpuffer:	200 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% SDS, 20% Methanol pH 8,2-8,6
2x- Probenpuffer:	6,3% SDS (w/v); 2,5% Uppergelstock (w/v); 10% Mercaptopropandiol (w/v); 10% Glycerin (v/v)
TAE-Puffer (50x):	2 M Tris/HCl; 250 mM Natriumacetat; 500 mM EDTA; pH 7,8
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 7,6
GST-Kopplungspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,1% NP40 frisch zugeben: 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0,2 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 20 µg/ml Aprotinin
Lysispuffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,14 mM NaCl; 3 mM MgCl ₂ , 0,5% NP40 frisch zugeben: 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0,2 mM PMSF, 20 µg/ml Aprotinin, 50 mg/m Lysozym

Weitere in dieser Arbeit verwendete Puffer sind in Kapitel 3 bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

2.2 Enzyme und dNTP`s

Alkalische Phosphatase	Roche
DNase I	Roche
dNTP`s	Roche
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs Inc.
Superscript II RT	Invitrogen
Taq- Polymerase	GE Healthcare
T4-DNA-Ligase	Promega
Viralex Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH

2.3 Molekulargewichtsmarker

DNA- Molekulargewichtsmarker:

Zur Größenbestimmung von DNA Fragmenten wurde der 1 kb+ Marker der Firma Invitrogen verwendet. Er enthält DNA Fragmente der Größen: 12 / 11 / 10 / 9 / 8 / 7 / 6 / 5 / 4 / 3 / 2 / 1,65 / 1 / 0,85 / 0,65 / 0,5 / 0,4 / 0,3 / 0,2 und 0,1 Kb.

Proteinmolekulargewichtsmarker:

Der Proteinmolekulargewichtsmarker für Immunoblots wurde nach den Angaben des LMW- Molekulargewichtsmarkers der Firma GE Healthcare angesetzt und enthält Proteine mit den Molekulargewichten: 94 / 67 / 43 / 30 / 20 und 14 kDa.

Für Polyacrylamid- Gele mit radioaktiven Proteinen wurde der ¹⁴C-methylated protein marker der Firma GE Healthcare verwendet. Er enthält ¹⁴C markierte Proteine der Molekulargewichte 200 / 92,5 / 68 / 46 / 30 und 14 kDa.

2.4 Bakterienstämme und Nährmedien

Zur Klonierung rekombinanter DNA und Amplifikation von Plasmiden wurde der *E.coli* Stamm pMOSblue (GE Healthcare, pMOS-blue T-vector-Kit)

verwendet und zur Proteinexpression der *E.coli* Stamm BL21-DE3 (Studier und Moffatt, 1986) eingesetzt. Beide Stämme wurden in Luria- Broth- Medium oder auf Luria- Broth- Agarplatten der Firma Invitrogen kultiviert. Zur Selektion rekombinanter Bakterien ist den Medien je nach Selektionsmarker des verwendeten Plasmides 100 µg Ampicillin bzw. 30 µg Kanamycin zugesetzt worden. Die Kultivierung zur Herstellung von transformationskompetenten pMOS oder BL21-DE3 Bakterien erfolgte in SOB-Medium (Trypton 20 g; Yeastextract (Difco) 5 g; NaCl 0,6 g; KCl 0,5 g ad 1000 ml).

2.5 Zelllinien

COS-1:	„African green monkey cells“, von Nierenzellen abgeleitete fibroblastenähnliche Zelllinie (Gluzman, 1981)
293T:	Epitheliale Zelllinie aus humanen, mit Adenovirus Typ 5 transformierten Nierenepithelzellen (Graham et al., 1977).
Hela:	Zelllinie kultiviert aus einem Zervixkarzinom einer 31-jährigen Frau (Scherer et al., 1953)
Jurkat:	T-Zelllinie aus dem Blut eines Patienten mit ALL (Schneider et al., 1977)
A3.01:	Klon einer humanen T-Zelllinie, gewonnen von einem Kind mit ALL, die bei HIV Infektion zytopatische Effekte zeigt und zu Grunde geht (Folks, 1985)
Gos 3:	Astro-Oligodendrogliom Zelllinie eines 55-jährigen Mannes (Halfter et al., 1998)
LN-405	Humane Astrocytom Zelllinie einer 62-jährigen Frau (Bodmer et al., 1989); exprimieren mRNA für TGF-β1 und G-TSF/TGF-β2 und exprimieren GFAP Protein
PM1	Humane T-Zelllinie, exprimiert CD4, CXCR4, CCR5 (Lusso et al., 1995)

2.6 Zellkulturmedien für Säugerzellen

DMEM: Die Zelllinien COS-1 und 293T wurden in DMEM (PAA Laboratories GmbH) Medium zuzüglich 10% fetalem Kälberserum (Invitrogen), 1% Na-pyruvat und 4er Antibiotikum (40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat) kultiviert.

2.7 Antikörper

2.7.1 Monoklonale Antikörper

- anti-Flag aus der Maus (SIGMA)
- anti-HA aus der Ratte (3F10, Firma Roche)

2.7.2 Polyklonale Antikörper

- anti-BEC-1 aus Kaninchen (Arbeitsgruppe Prof. Müller-Lantzsch)

2.7.3 Peroxidase (POX)-gekoppelte Zweitantikörper

- anti Ratte-POX aus Kaninchen (Sigma)
- anti Kaninchen-POX aus der Ziege (Sigma)
- anti- Maus-POX aus Kaninchen (Sigma)

2.8 Chemikalien und andere Reagenzien

2.8.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den nachfolgenden Firmen in reinst Form bezogen: Sigma Aldrich (München),

Serva (Heidelberg), Biozym (Rockland, USA), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt).

2.8.2 „Kits“ und Transfektionsreagenzien

- | | |
|--|--------------------|
| ○ <i>Gene-clean</i> - Kit | Dianova |
| ○ ECL <i>Western Blotting detection reagent</i> | GE Healthcare |
| ○ Nanofectin TM | PAA |
| ○ NucleoSpin [®] Extract | Macherey und Nagel |
| ○ Nucleobond Plasmidextraktion | Macherey und Nagel |
| ○ T7- TNT <i>reticulocyten-coupled in vitro transcription and translation system</i> | Promega |

2.8.3 Photochemikalien

- | | |
|----------------------------------|-------------------|
| - Röntgen- Entwickler Konzentrat | ADEF0 Chemie GmbH |
| - Röntgen- Fixier Konzentrat | ADEF0 Chemie GmbH |
| - ECL- Hyperfilm | GE Healthcare |

2.8.4 Radiochemikalien

- | | |
|--|----------------|
| - ³⁵ S- translabled Methionin/Cystein | MP Biomedicals |
|--|----------------|

2.9 Membranen

- | | |
|--------------------------------|-----------|
| - Immobilon-P Transfer Membran | Millipore |
|--------------------------------|-----------|

2.10 Oligonukleotide

Primer (MWG/Invitrogen/Operon):

Die nachfolgend aufgelisteten Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet zur Herstellung von Plasmidkonstrukten.

BEC EGFP Eco For	3'GGGAAAGAATTCGATGCCGGCCATGCGG 5'
BECFlagrevBam2	3'CCCTTTGGATCCTTACTTGTCGTCGTC GTCCTTGTAGTCGACCCCTGTGCCTTC 5'
BEC 2600 FlagrevBam	3'GGGAAAGAATTCGATGCCG GCCATGCGG 5'
HIVTMpSG5HAEcoFor	3'GCGCGCGAATTCCCA CCATGGCAGTGGGAATA 5'
HIVTMpSG5HABamRP	3'GCGCGCGGATCCTAGCAAATCCT 5'
HIVOMHARedRP	3'CGCCGCGAATTCTCATGCGTAATCC GGTAC 5'
HIVOMpDsRedMonoFP	3'GTGGTGAATTCGATG AGAGTGAAGGAG 5'
HIVOMpSG5HAEcoFP	3'GTGTGTGAATTCATGAGAGTGAAGGAG 5'
HIVOMpSG5HABamR	3'GGGAAAGGATCCTCTTTTTTCTCTCTGC 5'
NTermFusionRev	3'TTTGGGCAACCATGGTGTCATTTTTCCA CAT 5'
NTermFusionFor	3'TAGCCCCCATGGTGAGTGCTACAGAAA 5'
HIVOM1minus150	3'TTCCGGGAATTCGTCATTTTTCCACAT 5'
HIVOM4EcoFor	3'GAGTCCGAATTCGAATTTTTCTACTG 5'
HIVOM3BamRev	3'CCATGAGGATCCTCACCC 5'
HIVOM1C-term-50	3'CCCAAAGAATTCGACTGAGGTGTTACA 5'
HIVOM01C-term-100	3'CCCAAAGAATTCCTCCATTATCATTCT 5'
HIVOM100For	3'GGGGCGGAATTCATGGTAGAACAGATG 5'
HIVOM-200For	3'GGGGCGGAATTCGTCATTACACAGGCC5'
HIVEnvFor	3'GGGAAAGAATTCAGTGCTACAGAAAAAT 5'
HIVEnvRev	3'TCTCTCGAATTCTTATAGCAAATCC 5'

HIVEnvTMFor	3'GGGAAAGAATTCGCAGTGGGAATAGG 5'
HIVGagEcoFor	3'GGGAATTCGATGGGTGCGAGAGCG 5'
HIVGagBamRev	3'CCCGGATCCTTGTGACGAGGG 5'
BecEcoFor	3'GAAGAGGAATTCCAGGGTAG TAGATGGC 5'
BecBamRev	3'GCGCGCGGATCCTTCTAGGGCTGGTAC 5'
GesEnvBgIIIFor	3'GGGAAAAGATCTAAATGAACCCATC 5'
GesEnvBgIIIRev	3'CTCTCTCAGATCTCTACACAGACAC 5'
EnvMinus	3'GCAATTAAGTAAAAATAGATCTTTTGG 5'
HERV-K-TM FP	3'GGGAAAAGATCTGATTCATTTTTAC 5'
MSRV-TM RP	3'GCGCGCGGATCCTATTTGTTGTGGGGC TTAG 5'
MSRVTMHABamRev	3'TCCTGCGGATCCTTAAGCATAATCAGGA ACATCATAAGGATAACTGCTTCCTACTG 5'
MSRVTMpSG5BamFor	3'GAAGAGGGATCCATGGTACCCATTCTTCC 5'
HERV-W-TM-RP	3'GCGCGCGGATCCTATTTGTTGCGGGG CTTAG 5'
HERV-W-TM-FP	3'GGGAAAGGATCCGAGTACCCATTCTTC 5'
HERV-W-Bac-Rev	3'GATAAGCGGATCCGACGACCGCTCTAAC 5'
MSRVGesBamRev	3'GCGCGCGGATCCTTAACTGCTTCCTAC 5'
HIVOM1C-term-50	3'CCCAAAGAATTCGACTGAGGTGTTACA 5'
MSRVOM1C-term-80	3'CCCAAAGGATCCTTCTCTTGCCTGACC 5'
MSRVOM1C-term-40	3'CCCAAAGGATCCGCTCACCAGGCGAGT ATG 5'
HIVOM1C-term-100	3'CCCAAAGAATTCCTCCATTATCATTCT 5'
HERV-K-TMFP2	3'GGGAAAAGATCTGTTTCATTTTTAC 5'
BecBamRev	3'GGGAAAGCGGCCGCTCAGACCCCT 5'
BecEGFPEcoFor	3'GGGAAAGAATTCGATGCCGGCCATGCGG 5'

2.11 Vektoren, Reporterplasmide und Konstrukte

2.11.1 parentale Vektoren

- pGEX-4T-1 Vektor:

Der pGEX-4T-1 Vektor der Firma GE Healthcare wird verwendet um Fusionsproteine mit der 26kDa großen Glutathion-S-Transferase (GST) herzustellen. Hierfür besitzt er eine Multiple- Cloning- Site (MCS), die direkt an das *gst*- Gen anschließt. Des Weiteren beinhaltet der 4,9 kb große Vektor ein *E.coli*BR322 „ori“ (*origin of replication*), ein Ampicillinresistenzgen, sowie ein *lac*^{I^q} Markergen. Das Fusionsprotein steht unter der Kontrolle eines chemisch induzierbaren tac-Promotors, der eine hohe Expressionsrate gewährleistet. Die Multiple-Cloning-Site des Vektors beinhaltet außerdem eine Thrombin-Erkennungssequenz.

- pEGFP-C1 Vektor:

Der Vektor pEGFP-C1 der Firma Clontech wird benutzt um Fusionsproteine mit dem grün- fluoreszierenden- Protein *green fluorescent protein* (GFP) und einem rekombinanten Protein zu erzeugen. Solche Konstrukte werden verwendet um Zelllokalisationsstudien von Proteinen durchzuführen. Die Expression der Fusionsproteine wird durch einen CMV-Promotor kontrolliert und die gebildeten Transkripte erhalten einen Poly-A-Schwanz aufgrund des nachfolgenden SV40-Polyadenylierungssignals. Außerdem enthält der Vektor die Resistenzgene für Kanamycin und Neomycin zur Selektion in Bakterien und in eukaryotischen Zellen, sowie ein *E.coli* „ori“ und ein f1-Phagen „ori“ für die Bildung von Einzelstrang DNA.

- pGEM[®]-T Vektor

Der pGEM[®]-T Vektor der Firma Promega wird zur Klonierung von PCR-Produkten der Taq- Polymerase verwendet, da diese Polymerase allen Amplifikaten am 3´Ende ein Desoxyadenosin anhängt. Diese DNA-Fragmente können ohne einen vorherigen Restriktionsverdau in den mit überstehenden Desoxythymidinenden offenen Vektor inseriert werden. Für die Ligation von Produkten ohne überhängende Desoxyadenosinenden steht alternativ eine

Multiple- Cloning- Site mit Erkennungssequenzen mehrerer Restriktionsenzyme zur Verfügung. Die erfolgreiche Insertion wird durch den Verlust des lacZ- Markergens in einem Blue/White Screening angezeigt. Mit Hilfe von T7-beziehungsweise SP6-RNA-Polymerasen, die ihre im Vektor enthaltenen spezifischen Promotoren erkennen, können „sense“ und „antisense“ RNA- Transkripte gebildet werden. Der Vektor besitzt außerdem ein Bakterien „ori“, das ihm die Fähigkeit zur autonomen Replikation im prokaryotischen System verleiht. Ein zweites „ori“ aus dem filamentösen Phagen f1 ermöglicht die Erzeugung von Einzelstrang- DNA. Des Weiteren kodiert der Vektor für ein Ampicillinresistenzgen, das zur Selektion transformierter Bakterien dient.

- pDsRed-C1-Vektor:

Der 4700 bp große Vektor der Firma Clontech mit einem Enhancer im CMV Promotor (P_{CMV}) enthält ein Gen, das für ein rotfluoreszierendes Protein (DsRed) kodiert. Der Vektor ist ein effizienter Expressionsvektor in Säugetierzellen und wird zur Expression von Fusionsproteinen verwendet. In die Multiple Cloning Site zwischen dem P_{CMV} Promotor und dem DsRed1-kodierenden Abschnitt können spezifische Gene eingebaut werden. Somit entsteht ein Fusionsgen, das aus dem N-terminalen Fremdgen und C-terminalen DsRed1-Gensequenz besteht. Die Fusionsproteine können auf diese Weise *in vivo* in den Zellen lokalisiert werden. Distal vom DsRed1-Gen befindet sich ein SV40 poly A-Signal. Der f1 ori des Vektors ermöglicht die Herstellung von ssDNA. Mit Hilfe des SV40 ori kann der Vektor in eukaryoten Zellen vermehrt werden, die das Antigen SV40 T produzieren. Der SV40 Promotor (P_{SV40}) ist den Kanamycin und Neomycin Resistenzgenen vorgeschaltet, dass die transfizierten Zellen gegen diese beiden Antibiotika resistent werden und die Kultur und Selektion in den Antibiotika enthaltenden Medien ermöglicht werden. Durch den pUC ori kann der Vektor auch in Bakterien repliziert werden.

-pSG5-Vektor:

Eukaryotischer Expressionsvektor (Stratagene) zur transienten Expression von Genen unter der Kontrolle des T7-Promotors des Simian- Virus 40 (SV40). Der 4,1kb große Vektor enthält eine Multiple- Cloning- Site mit Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme zur Integration von Gensequenzen. Das vorhandene Resistenzgen für Ampicillin erlaubt ein selektives Wachstum transformierter Zellen.

-phCMV-pA-Vektor

Der 4,6 kb große Vektor verfügt über einen expressionsstarken CMV-Promotor. Er dient zur *in vivo* Expression im eukaryotischen System. Als Selektionsmarker besitzt phCMV-pA eine Ampicillin Resistenz.

-pGBKT7 Vektor (Clontech Biosciences)

Der Expressionvektor pGBKT7 wird zur Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen mittels *in vitro* Translation benutzt und ermöglicht somit den Nachweis von Protein-Proteinbindungen in Pulldownanalysen. Der Vektor kodiert für einen T7 Promotor, der die Transkription und Translation reguliert. Bei der Expression werden die Proteine mit einer GAL4-DNA Bindungsdomäne fusioniert. Als Selektionsmarker besitzt pGBKT7 ein Kanamycin Resistenzgen.

2.11.2 Konstrukte

Bei den im Folgenden beschriebenen Konstrukten wurden die verwendeten Fragmente durch die angegebenen Primer in einer PCR amplifiziert, bzw. durch Spaltung der angegebenen Konstrukte gewonnen. Die PCR Fragmente wurden nach der Amplifikation ebenfalls von den bezeichneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und alle Fragmente mit den entsprechend gespaltenen Vektoren ligiert.

Konstrukt	Strategie	Forward Primer	Reverse Primer	Template	Vektor	Schnittstellen
pEGFP-BEC-1	PCR	BecEGF PEcoFor	BecBam Rev	pGEM-BEC	pEGFP-C1	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>
pSG5-BEC-1	Restriktionsverdau aus pEGFP-BEC-1	-	-	pEGFP-BEC-1	pSG5-C1	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>
pSG5-BEC-1-Flag	PCR	BecEGF PEcoFor	BecFlagrev Bam2	pSG5-BEC-1	pSG5-C1	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>
pSG5-BEC2600-Flag	PCR	BecEGF PEcoFor	Bec2600 Flagrev Bam	pSG5-BEC-1	pSG5-C1	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>
pSG5-HIV Env-SU-HA	PCR	HIVOMp SG5 HA EcoFor	HIVOMp SG5 HA BamRP	HXB2-pBru Δ pol	pSG5-HA-C1	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>
pDsRed-HIV Env-SU	PCR	HIVOMp DsRedMonoFP	HIVOM HARedRP	HXB2-pBru Δ pol	pDsRed-Mono	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>
pSG5-HIV Env-TM-HA	PCR	HIVTM pSG5 HA EcoFP	HIVTM pSG5 HA BamRP	HXB2-pBru Δ pol	pSG5-HA-C1	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>
pSG5-HIV Gag-HA	PCR	HIV Gag EcoFor	HIV Gag BamRev	pGBKT7-HIV Gag	pSG5-HA-C1	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>
pGBKT7-HIV Env-SU	PCR	HIV-Env For	HIV Env- Rev2	HXB2-pBru Δ pol	pGBKT7	
pGBKT7-HIV Env-SU-50	PCR	HIV OM-50	HIV Env Rev2	HXB2-pBru Δ pol	pGBKT7	<i>EcoRI</i>

pGBKT7- HIV Env- SU-100	PCR	HIV OM- 100 For	HIV Env Rev 2	HXB2- pBruΔpol	pGBKT 7	<i>EcoRI</i>
pGBKT7- HIV Env- SU-200	PCR	HIV OM- 200 For	HIV Env Rev 2	HXB2- pBruΔpol	pGBKT 7	<i>EcoRI</i>
pGBKT7- HIV SU1 C-term-50	PCR	HIV Env For	HIV OM1 C-term- 50	HXB2- pBruΔpol	pGBKT 7	<i>EcoRI</i>
pGBKT7- HIV Env- SU1 C- term-100	PCR	HIV Env For	HIV OM1 C-term- 100	HXB2- pBruΔpol	pGBKT 7	<i>EcoRI</i>
pGBKT7- HIV Env- SU C- term-150	PCR	HIV Env For	HIV OM1 minus 150	HXB2- pBruΔpol	pGBKT 7	<i>EcoRI</i>
pGBKT7- HIV Env- SU Fusion	PCR	N-term Fusion For	N-term Fusion Rev	HXB2- pBruΔpol	pGBKT 7	<i>NcoI</i>
pGBKT7- HIV Env- SU2 1.Teil	PCR	HIV OM Mitte For	HIV OM3Bam Rev	HXB2- pBruΔpol	pGBKT 7	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>
pGBKT7- HIV Env- SU2 2.Teil	PCR	HIV OM4 EcoFor	HIV Env Rev2	HXB2- pBruΔpol	pGBKT 7	<i>EcoRI</i>
pHCMV- MSRV Env-TM- HA	PCR	MSRV TMpSG5 BamFor	MSRV TMHA BamRev	phCMV- MSRV Env	phCMV	<i>BamHI</i>

pGBKT7-MSRV Env-SU4	PCR	MSRVO M1C-term, 40	MSRVpE G SpBam For	pGBKT7-MSRV Env	pGBKT 7	<i>BamHI</i>
pGBKT7-MSRV Env-SU5	PCR	MSRV OM1C-term, 617For	HERV-W TM RP	pGBKT7-MSRV-SU 2	pGBKT 7	<i>BamHI</i>

Die Konstrukte pGEX-BEC C-term und pGBKT7-MSRV Env Su 1, 2, 3 waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Die Konstrukte pGEX-BEC1.1 und pGEX-BEC1.2 wurden im Rahmen der Dissertation von Pearl van Heteren angefertigt.

2.12 Mikroskope, Computersoftware und Internetseiten

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurde mit einem Leitz, Aristoplan Mikroskop (Institut für Virologie, Uniklinikum Homburg) vorgenommen. Die Dokumentation erfolgte mit der Axio-Cam Color Kamera der Firma Zeiss und der angeschlossenen Software Axio Vision 3.0. Die anschließende Bildbearbeitung erfolgte mit Corel- Paint 12 und PowerPoint von Windows XP.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ferner folgende Computersoftware verwendet: Microsoft Windows Office Vista und Corel Draw 12.

DNA- und Protein- Sequenzanalysen wurden mit Hilfe folgender Internetadressen durchgeführt:

NCBI Sequences: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI Blast: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

BCM- Search Launcher: <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>

Web-cutter: <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>

SwissProt: http://www.expasy.org/expasy_urls.html