

***In vitro*-Selektion
am lentiviralen Transaktivator-Protein
aus HIV-1**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Dipl. Biochem.

Gesa Jonas

aus Linden/ Hessen

Bayreuth, 2002

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Willbold durchgeführt und entstand im Zeitraum von Februar 1999 bis Februar 2002.

Promotionsgesuch eingereicht am: 19.02.2002

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 27.05.02

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dieter Willbold

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Franz X. Schmid

Für meine Eltern

1	EINLEITUNG	1
1.1	Protein-RNA Wechselwirkungen	1
1.2	RNA Bindemotive	2
1.3	<i>In vitro Selektion</i>	4
1.4	Phagen-Display: Variation mit Hilfe von Bakteriophagen	6
1.4.1	Strukturelle Grundlage für das M13-Phagen-Display	6
1.4.2	Vektortypen	7
1.4.3	Anwendungsmöglichkeiten	9
1.5	Das Humane Immundefizienz Virus HIV-1	12
1.6	Das Tat-Protein aus HIV-1	13
1.6.1	Die Struktur von HIV-Tat	13
1.6.2	Steigerung der Elongation der Transkription durch Tat	15
2	ZIEL DER ARBEIT	17
3	MATERIALIEN	18
3.1	Bakterienstämme	18
3.2	Phagen, Phagemide und Plasmide	18
3.2.1	Das pAK-System	20
3.2.2	Ph.D 12 Phagenbibliothek	21
3.3	Oligonukleotide	21
3.4	Nährmedien, Puffer und Lösungen	23
3.4.1	Nährmedien	23
3.4.2	Puffer	24
3.4.3	Lösungen	24
3.5	Enzyme und Proteine	24
3.6	Nukleotide und Nukleinsäuren	25
3.7	Biochemikalien und Chemikalien	25
3.8	Sonstige Materialien	25
3.9	Software	26
4	METHODEN	27
4.1	Kultivierung von Bakterien	27
4.2	Bestimmung des Bakterientiters	27
4.3	Produktion von Phagen	28
4.3.1	M13-Phagen	28
4.3.2	VCSM-Helferphagen	28
4.3.3	Verpacken von pAK-Phagemiden	28
4.3.4	PEG-Fällung von Phagen	29
4.3.5	Bestimmung des Phagentiters	29

4.4	Kultivierung eukaryotischer Zellen	30
4.5	Absorptionsmessung	30
4.5.1	Bestimmung der Bakteriendichte	30
4.5.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
4.5.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	31
4.6	Fluoreszenzspektroskopische Messungen	32
4.6.1	Bestimmung von Dissoziationskonstanten (K_D) mit Fluoreszenzmessungen	32
4.7	Zentrifugation	33
4.8	Elektrophoretische Verfahren	33
4.8.1	Agarosegelelektrophorese	33
4.8.2	Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
4.8.3	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	34
4.8.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
4.9	Färben von Proteinen und DNA	35
4.9.1	Coomassie-Blau-Färbung	35
4.9.2	Silberfärbung	35
4.9.3	Ethidiumbromid-Färbung	36
4.10	Fällung und Reinigung von Nukleinsäuren	36
4.10.1	Ethanolpräzipitation	36
4.10.2	Reinigung über Silikagel	36
4.10.3	Mikrodialyse	36
4.11	Präparation von Plasmid-DNA	37
4.11.1	Präparation über Anionenaustauschchromatographie	37
4.12	Enzymatische Modifikationen	37
4.12.1	Restriktion	37
4.12.2	Phosphorylierung von 5'-Enden	37
4.12.3	Dephosphorylierung von 5'-Enden	37
4.12.4	Ligation	38
4.13	Annealing von Oligonukleotiden	38
4.14	Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
4.14.1	PCR mit Linker-Primern	38
4.14.2	Kolonie-PCR	39
4.14.3	Ortsspezifische-Mutagenese durch 2-Schritt-PCR	39
4.15	Kassettenmutagenese	40
4.16	Reinigung von DNA-Fragmenten	40
4.16.1	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
4.16.2	Reinigung über Polyacrylamidgel	41
4.17	Sequenzierung von DNA	41
4.18	Übertragung von DNA	41

4.18.1	Transformation von Bakterien mit der CaCl ₂ -Methode	41
4.18.2	Elektroporation von Bakterien	42
4.18.3	Transfektion von Eukaryotenzellen	42
4.19	Färbung von Eukaryotenzellen	43
4.20	Isolierung von bakteriell überexprimiertem Protein	43
4.20.1	Herstellung von Zellrohextrakt und Zellaufschluß	43
4.20.2	Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose	44
4.20.3	Affinitätschromatographie an Metal-Chelating-Sepharose	44
4.21	Dualer Luciferase-Assay	44
4.22	Gelretardationsexperimente	45
4.23	Kernspinresonanzspektrometrie	45
4.23.1	Probenvorbereitung	45
4.23.2	Messbedingungen	46
4.24	Selektionsprozeduren	46
4.24.1	Phagenselektion mit SA-Magnetkügelchen	46
4.24.2	Selektion in SA-beschichteten Röhren	48
5	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	50
5.1	Ternäres Phagen-Display für die Bindung von HIV-Tat an TAR-RNA in Gegenwart von Cyclin T1	50
5.1.1	Konstruktion von pAK-tat-mt8bas	50
5.1.2	Reinigung von HisCycT1-272Δ	52
5.1.3	Bestimmung der relativen Bindungsfähigkeit	53
5.1.4	Testselektion mit den Varianten pAK-tat-wt und pAK-tat-mt8bas	56
5.2	Konstruktion mehrerer pAK-tat-random Bibliotheken	57
5.3	Größe und Qualität der pAK-tat-Bibliotheken	60
5.4	Selektion der pAK-tat-Phagen Bibliotheken	64
5.5	Charakterisierung der resultierenden HIV-Tat Varianten	69
5.5.1	Konstruktion von HIV-1-Tat Expressionsplasmiden	69
5.5.2	<i>In vitro</i> Aktivitätstest	73
5.5.3	<i>In vivo</i> Aktivitätstest	77
5.5.4	Wahl der Strategie für die Modellierung von Tat-Varianten	83
5.6	Selektion einer Ph.D-12-Phagenbibliothek	85
5.6.1	Charakterisierung selektierter Peptide	88
5.6.2	Eindimensionale NMR-Spektroskopie an HIV-TAR.	91
6	DISKUSSION	94
6.1	Etablierung eines ternären Phagendisplay-Systems	94
6.2	Selektion der Tat-random-Bibliotheken	96
6.3	Die Selektion hat Tat-Varianten ergeben, die an HIV-TAR-RNA binden	98

6.4	Alle selektierten Varianten besitzen <i>in vivo</i> Aktivität	104
6.5	Identifizierung HIV-TAR-RNA bindender Peptide	106
7	ZUSAMMENFASSUNG	111
8	SUMMARY	113
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	115
10	LITERATURVERZEICHNIS	117
11	ANHANG	131
11.1	Nukleinsäuresequenz von HIV- <i>tat</i> -wt(E/E)	131
11.2	Nukleinsäuresequenz von CyclinT272Δ	132
11.3	Sequenzen der pAK- <i>tat</i> -random Ausgangsbibliotheken	134
11.4	Ergebnis der Selektionen einer Ph.D.12 Peptidbibliothek	136
	DANKSAGUNG	139
	ERKLÄRUNG	140

1 Einleitung

1.1 Protein-RNA Wechselwirkungen

Die RNA hat viele essentielle und diverse Funktionen in einer Zelle und gerade RNA-Protein Wechselwirkungen spielen eine zentrale Rolle in vielen biochemischen Prozessen. So ist RNA ein Bestandteil einiger Ribonukleoproteine, wie z. B. des Ribosoms, des Spleißosoms und der Signal-Erkennungspartikel für den Import von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum oder das Periplasma. Weitere RNA-Protein-Komplexe stellen die eukaryotische Telomerase, welche den linearen Chromosomen Stabilität der Enden verleiht sowie der Ribonuklease P, ein Enzym, das an der Prozessierung von prä-tRNA-Transkripten beteiligt ist, dar. Für einige dieser Ribonukleoproteine, wie dem Ribosom und der Ribonuklease P, wurde gezeigt, dass die RNA innerhalb dieses Komplexes nicht nur für die Stabilität dieser Struktur sorgt, sondern dass sie der Träger der katalytischen Funktion dieser RNA-Protein-Komplexe ist (Guerrier-Takada et al., 1983; Nissen et al., 2000).

Das Ribosom besteht aus einer kleinen und einer großen Untereinheit, die wiederum aus mehreren Protein- und RNA-Komponenten bestehen. Die Ribosomenarchitektur wird durch eine Vielzahl spezifischer RNA-Protein, Protein-Protein und RNA-RNA Wechselwirkungen bestimmt. Obwohl die Größe und die individuelle Zusammensetzung der Ribosomen innerhalb und unter den Organismenreichen differiert, sind der strukturelle Kern und fundamentale Mechanismen der Funktionsweise in allen Lebensformen konserviert (Hill, 1990; Woese et al., 1983). Allgemein wird davon ausgegangen, dass das Auftreten des Ribosoms einen entscheidenden Schritt in der frühen Evolution darstellt (Ramakrishnan & White, 1998). Es wird vermutet, dass ribosomale Proteine als erste zelluläre Proteine Wege zur spezifischen Erkennung und Bindung definierter Nukleinsäuresequenzen entwickelt haben. Daher ist es möglich, dass diese RNA-Erkennungsstrategien im Laufe der Evolution von anderen zellulären Prozessen mit Nukleinsäurebeteiligung übernommen wurden. Es könnten aber auch ribosomale Proteine aus schon bestehenden zellulären RNA- oder DNA-bindenden Proteinen neu entstanden sein (Draper & Reynaldo, 1999b).

Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung von Protein-RNA-Wechselwirkungen ist die korrekte Aminoacylierung einer tRNA mit ihrer zugehörigen Aminosäure durch eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase (Moras, 1992). Dieser Schritt stellt eine wesentliche Grundlage in der Synthese von Proteinen dar. Die Regulation einer Vielzahl an biochemischen Prozessen beruht auf einer spezifischen Wechselwirkung zwischen RNA und Protein. Dies ist zum Beispiel bei der Inhibierung der Proteinsynthese auf der Ebene der Translation durch die Bindung von mRNA-Strukturelementen an Proteine der Fall (Nomura et al., 1984; Warner et

al., 1985; Zengel & Lindahl, 1994; Kraft et al., 1999). Die Bildung von mRNA-Komplexen ist des Weiteren an der Regulation der Transkription durch Antitermination und Attenuation (Greenblatt et al., 1993; Rutberg, 1997; Babitzke et al., 1994), der Termination der Transkription (Henkin, 2000) und der Regulation des Abbaus von mRNAs beteiligt (Sachs & Wahle, 1993; Wahle & Ruesegger, 1999). Spezifische Protein-RNA-Wechselwirkungen können zelluläre Signalkaskaden aktivieren (Robertson & Mathews, 1996; Siomi & Dreyfuss, 1997), die Replikation viraler RNA regulieren (Karn et al., 1994) und die Verpackung der genomischen RNA bestimmter Viren in die Virushülle steuern (Watanabe & Temin, 1982; Mann & Baltimore, 1985; Lever et al., 1989; Aldovini & Young, 1990).

Obwohl DNA-Bindungsproteine gut untersucht sind, ist kaum bekannt, wie Proteine RNA erkennen. Diese Lücke an Informationen spiegelt die kleinere Anzahl an mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenstrukturanalyse gelösten Protein-RNA Strukturen gegenüber den Protein-DNA Strukturen wider.

1.2 RNA Bindemotive

RNA Moleküle können je nach ihrer Funktion in verschiedene Klassen eingeteilt werden (messenger RNA, transfer RNA, ribosomale RNA, virale RNA, small nuclear RNA). Dementsprechend gibt es auch eine Vielzahl an RNA-bindenden Proteinen. Diese können stabilisierende, schützende, verpackende, katalysierende und transportierende Funktion haben. Sequenzanalysen verschiedener RNA-bindender Proteine aus unterschiedlichem funktionellen Kontext führten zur Identifizierung von häufig auftretenden RNA-Bindemotiven. Die bekanntesten sind das Ribonukleoprotein Motiv, die K-Homologie Domäne, das dsRNA-Bindemotiv und die Kälteschock Domäne (eine Unterklasse des Oligonukleotid/Oligosaccharid Bindemotivs) (Nagai, 1996; Graumann & Marahiel, 1998). Nicht alle RNA-bindenden Proteine lassen sich in eine dieser Klassen einordnen.

Untersuchungen am Laktose-Repressor (Jacob & Monod, 1961) zeigten schon sehr früh, dass ein Protein in der Lage ist, eine einzige DNA Sequenz innerhalb eines ganzen Genoms spezifisch zu erkennen und zu binden (Ptashne, 1967). Diese Eigenschaft findet sich auch bei RNA-bindenden Proteinen wieder. Strukturell können RNA-bindende Proteine in Kategorien eingeteilt werden. Die meisten werden durch zwei Hauptkategorien erfasst. Einerseits Proteine, die an die RNA Furchen binden und andererseits Proteine, die über ein β -Faltblatt an die RNA binden (Draper, 1999a).

Im Gegensatz zur B-Form der dsDNA, in der die große Furche breit und tief ist, liegt die doppelsträngige RNA meist in der A-Form vor. Hier ist die große Furche schmal und tief und ist dadurch für Protein-Sekundärstrukturen nicht im selben Umfang zugänglich wie die große Furche der DNA. Andererseits weisen RNA-Strukturen aber eine große Vielfalt auf. Zum einen gibt es doppelsträngige Bereiche aus kanonischen Basenpaaren, die selten mehr als eine

halbe Helixumdrehung umfassen. Dadurch ist ein Großteil der Oberfläche der großen Furche von beiden Enden her zugänglich (Draper, 1999a). Zum anderen weiten Verformungen durch nicht kanonische Basenpaarungen und Ausbuchtungen die RNA Helix stark genug auf, so dass Protein-Sekundärstrukturen leicht eindringen können. Die RNA-Erkennung von „Groove binding“-Proteinen erfolgt meist durch ein Sekundärstrukturelement, wie z.B. einer α -Helix oder eine Schleife.

Eine weitere Möglichkeit zur Erkennung der RNA beruht auf dem „Arginin-reichen Motiv“ (ARM). Obwohl dieser Terminus eigentlich nicht zutreffend ist, da diese Proteine in ihrer Struktur zu verschieden sind und es innerhalb dieser Gruppe auch keine konservierten Arginin-Positionen gibt, wird diese Bezeichnung beibehalten (Draper, 1999a). Zu dieser Gruppe zählt z.B. das N-Protein des Phagen λ . Es verhindert die Transkriptionstermination einiger Phagen-Operons. Der strukturlose N-Terminus des Proteins faltet sich zu einer α -Helix, sobald es an die B-Box RNA-Haarnadel bindet (Tan & Frankel, 1995; Van-Gilst & Von-Hippel, 1997; Schärpf et al., 2000). NMR-Untersuchungen am Komplex zeigten, dass die α -Helix an einen stabilen GNRA-„Tetraloop“ bindet und von dort in die große Furche eintritt. Dabei wird die α -Helix stark verformt und der Kontur der RNA-Helix angepasst (Legault et al., 1998).

Das Tat-Protein des Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) beinhaltet ein ARM, welches an eine Haarnadel (transactivation response region, TAR) der viralen mRNA bindet. Die Helix enthält zwei ungepaarte Basen. Eine davon (U10) befindet sich in der großen Furche und bildet ein Hoogsteen-Basentriplett mit A13 und U24. Dies verformt wiederum die Helix so stark, dass sich die große Furche öffnet und dem Tat-Protein die Bindung als irreguläre β -Haarnadel ermöglicht. Dabei haben beide β -Stränge Kontakt zur RNA-Helix. Ausgehend von den Seitenketten dreier Arginine und zweier Amidbindungen des Protein-Rückgrats werden basenspezifische Wasserstoffbrücken zur RNA ausgebildet (Puglisi et al., 1995; Ye et al., 1995). Ähnlich verhält es sich auch bei der Bindung des Rev-Proteins des humanen Immunodefizienz Virus (HIV) an das „rev responsive element“ (RRE). Die große Furche der RRE-RNA, bestehend aus aufeinanderfolgenden nichtkanonischen Basenpaaren wird so aufgeweitet, dass ein Peptid aus dem Rev-Protein in einer α -helikalen Konformation eine Bindung eingehen kann (Battiste et al., 1996).

Die sequenzspezifische Bindung von RNA-Einzelstrangbereichen wurde bei β -Faltblatt-Proteinen beobachtet. Schleifen und Ausbuchtungen einer gefalteten RNA lassen einige Nukleotide relativ unstrukturiert und einige RNAs enthalten komplett einzelsträngige Bereiche. Proteine neigen dazu, Nukleotide aus Einzelstrangbereichen ohne wesentliche Beteiligung des RNA-Rückgrates zu binden. Eine der verbreitetsten RNA-Bindedomänen dieser β -Faltblatt-Proteine ist die Ribonukleoprotein (RNP) Motiv Domäne. Diese Proteinklasse zeigt ein $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ Faltungsschema, wobei sich ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt ausbildet, das gegen zwei quer darüber liegende α -Helices gepackt ist (Nagai et

al., 1990; Wittekind et al., 1992). Die Spezifität der RNA-Bindung wird vermutlich durch die weniger konservierten Reste in den die RNP-Motive verbindenden Schleifen sowie durch Aminosäuren an den Rändern der Motive erreicht (Scherly et al., 1990).

Die humane U1A RNP-Domäne ist in der Lage, die Sequenz AUUGCAC sowohl im Kontext einer Haarnadelschleife (Stamm-Schleife II von U1 snRNP) als auch in Form einer internen Schlaufe (U1A Polyadenylierung Inhibierendes Element) zu erkennen (Scherly et al., 1990; van Gelder et al., 1993). Die selbe Nukleotidsequenz wird vom U1A Protein auch in einem Zufalls-RNA-Pool in Verbindung mit einer Haarnadelschleife oder einer unstrukturierten Nukleotidsequenz erkannt (Tsai et al., 1991). Das U1A Protein bindet demzufolge stark sequenzspezifisch. Die Basen G, C und A dieser Sequenz werden gegen die Seitenketten von aromatischen Aminosäuren gestapelt (stacking interaction). Diese Aromaten-Positionen sind in RNP-Motiv Proteinen konserviert. Der für die RNA-Bindung verantwortliche Proteinteil besteht hauptsächlich aus einer β -Faltblattoberfläche. Dabei ist der loop zwischen β 2 und β 3 in Abwesenheit der RNA nur wenig strukturiert (Nagai et al., 1990). Ebenso wenig ist in der freien RNA der Loop in der Haarnadel strukturiert (Oubridge et al., 1994). Der Komplexbildung, bei der es zu inter- und intramolekularen Kontakten kommt, liegt demnach eine räumliche Strukturanpassung beider Bindungspartner zugrunde. Diese gegenseitige Anpassung („induced fit“) könnte die Ursache für diese hochspezifische Komplexbildung sein.

1.3 *In vitro* Selektion

Die natürliche molekulare Evolution ist ein Prozess, der nicht auf ein bestimmtes Ziel gerichtet ist. Dabei werden erfolgreiche Moleküle selektiert und ihre genetische Information wird weiterverbreitet. Im Gegensatz zur natürlichen Evolution, die über einen langen Zeitraum und mit einer begrenzten Anzahl an Ausgangsvarianten stattfindet, kann bei einer *in vitro*-Selektion ein großer Pool an Ausgangsvarianten innerhalb kurzer Zeit auf eine bestimmte Eigenschaft hin selektiert werden. Voraussetzung für eine *in vitro*-Selektion ist die Konstruktion sogenannter kombinatorischer Bibliotheken.

Grundsätzlich unterscheidet man biologische, sich selbst replizierende Bibliotheken und chemisch-synthetische Bibliotheken. Biologische Bibliotheken bestehen aus einer Population eines randomisierten Biopolymers. Als Bausteine eines Biopolymers stehen Aminosäuren und Nukleotide zur Verfügung. Jedes Molekül einer Bibliothek besitzt eine bestimmte Form und Struktur, worauf Wechselwirkungen mit anderen Molekülen beruhen. Es kann dann auf die Ausbildung einer Interaktion mit einem beliebigen Zielmolekül, dem Liganden, selektiert werden (Kenan et al., 1994).

Eine *in vitro*-Selektion basiert demnach, ausgehend von einer möglichst großen Zahl unterschiedlicher Moleküle auf einem beliebig oft wiederholbaren Zyklus von Selektion und Amplifikation, in dessen Verlauf sich diejenigen Moleküle anreichern, die den Selektionskriterien am ehesten entsprechen. Daraus ergeben sich weitere Bedingungen, die für eine erfolgreiche Selektion erfüllt sein müssen. Zusätzlich zum Vorhandensein einer kombinatorischen Bibliothek muss diese auf eine bestimmte Eigenschaft hin selektierbar sein, und die selektierbaren Varianten müssen amplifizierbar sein (Kenan et al., 1994).

Diese Voraussetzungen können relativ einfach für eine Nukleinsäurebibliothek erfüllt werden, da diese die Information für ihre Vervielfältigung bereits beinhaltet. Als Beispiel für die Selektion einer RNA-Bibliothek sei hier das von Tuerk und Gold eingeführte „SELEX“-Verfahren (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) genannt (Tuerk & Gold, 1990).

Die Selektion von Peptidbibliotheken gestaltet sich schwieriger, da Peptide nicht direkt die Information für ihre eigene Replikation enthalten. Aus diesem Grund wurden mehrere biologische Systeme entwickelt, bei welchen das Peptid für eine Selektion zugänglich ist und mit seiner kodierenden DNA in Verbindung steht. Dies ermöglicht eine effektive Selektion, ohne dass nach jeder Selektionsrunde die erhaltenen Varianten isoliert und charakterisiert werden müssen. Man unterscheidet zwei Arten von Peptidbibliotheken. Bei den als Epitop- oder Random-Peptid-Bibliotheken bezeichneten Pools werden randomisierte Peptide einer fixierten Länge zwischen sechs und 20 Aminosäuren präsentiert. Diese „Epitope“ können dann auf eine bestimmte Eigenschaft hin selektiert werden (Devlin et al., 1990). Bei der zweiten Art von Peptidbibliotheken können Proteine von einer Länge bis zu mehreren 100 Aminosäuren präsentiert werden (Kay, 1994).

Obwohl in der Literatur mehrere Display-Systeme beschrieben sind, so z.B. das Display auf der *E. coli*-Oberfläche (Charbit et al., 1987), das Plasmid-Display (Cull et al., 1992), das Ribosomen-Display (Hanes & Pluckthun, 1997), das mRNA-Display (Wilson et al., 2001) und das Polysomen-Display (Mattheakis et al., 1994), hat sich in der Anwendung das Phagendisplay durchgesetzt. Dieses Display-System wurde erstmals von G. P. Smith vorgestellt. Er konnte Segmente des *E. coli* β -Galaktosidase-Gens in das Hüllprotein Gp3 des Bakteriophagen M13 klonieren und erhielt dann intakte Phagenpartikel, die mit einem β -Galaktosidase-monoklonalem-Antikörper reagierten (Smith, 1985). Auf dieses System wird in Kap. 1.4 noch genauer eingegangen werden, da es auch in dieser Arbeit zur Anwendung kommt. Neben den bisher vorgestellten prokaryotischen Display-Systemen wurden inzwischen auch eukaryotische Systeme entwickelt. Diese haben den Vorteil, dass sie auch zu posttranslationalen Modifikationen fähig sind. Als Beispiel sei hier das Hefe-Display genannt (Boder & Wittrup, 1997).

1.4 Phagen-Display: Variation mit Hilfe von Bakteriophagen

Beim Phagen-Display handelt es sich um eine effektive Methode zur Selektion von Peptidbibliotheken, wobei Bakteriophagen zum Einsatz kommen. Die Bakteriophagen exponieren auf ihrer Oberfläche Proteine, die gewisse Veränderungen, z.B. Insertionen in bestimmte Sequenzbereiche, tolerieren. Die zuerst eingebauten Elemente waren sechs bis 15 Aminosäure lange Peptide, deren Sequenz randomisiert war. Mit derart veränderten Bakteriophagen wurden Bakterien infiziert, so dass neue Phagen mit entsprechend verändertem Oberflächenprotein produziert wurden. Dadurch ist es möglich, Peptidsequenzen aufgrund ihrer Eigenschaften zu selektieren, die sie auf der Oberfläche der intakten Phagenpartikel präsentieren. Die genetische Information zu ihrer Vervielfältigung ist auf der DNA des Phagenpartikels kodiert und ermöglicht so den Vermehrungsschritt in der *in vitro*-Selektion (Smith, 1993). Auf diese Weise wurden solche Phagen dann z.B. zur Charakterisierung von Bindungsstellen monoklonaler und polyklonaler Antikörper eingesetzt. Gegenwärtig können jedoch auch große Proteine in bestimmte, speziell konzipierte Phagen eingebaut werden, was anhand von Antikörpern, Antigenfragmenten, Enzymen sowie einer Reihe anderer Proteine bis zu einer Größe von etwa 80 kDa demonstriert werden konnte (Katz, 1997).

Filamentöse Bakteriophagen (z.B. M13, fd, f1), die *E. coli* F⁺-Zellen befallen, bieten aufgrund ihrer Architektur die ideale Grundlage für die Präsentation von Peptiden. Drei Hüllproteine der Phagen (Gp3, Gp6 und Gp8), kodiert von den Genen III, VI und VIII, besitzen oberflächenexponierte N-terminale Domänen, die fremde Peptidinsertionen tolerieren. Während die meisten Phagen-Display-Systeme auf den erwähnten filamentösen Phagen basieren, gibt es auch Systeme basierend auf den Bakteriophagen T4 (Ren et al., 1996), T7 (Danner & Belasco, 2001) und λ (Sternberg & Hoess, 1995).

1.4.1 Strukturelle Grundlage für das M13-Phagen-Display

Der filamentöse Phage M13 stellt ein flexibles Stäbchen dar, etwa 1 μm lang und 6 nm im Durchmesser. Das Hüllprotein Gp8 („major coat protein“) besteht aus 50 Aminosäuren. Es trägt zu 87 % zur Phagenhülle bei und liegt pro Phagenpartikel in 2700 Kopien vor. Das durchgehend α -helikale Gp8 kann in vier Segmente unterteilt werden: Die Aminosäuren eins bis fünf bilden ein flexibles Element, das Peptidinsertionen toleriert. Das nächste Segment bildet eine überwiegend negativ geladene amphipathische α -Helix. Der Abschnitt der Aminosäuren 25 bis 35 ist stark hydrophob und liegt im Phagenpartikel im Inneren der Proteinhülle verborgen. Der C-Terminus bildet wiederum eine amphipathische α -Helix, die überwiegend positiv geladen ist und mit der Phagen-DNA interagiert (Marvin et al., 1994). Eine Spitze der Phagenhülle wird durch jeweils fünf Kopien der Hüllproteine Gp3 (406 Aminosäuren) und Gp6 (113 Aminosäuren) gebildet. Das Gp3 („minor coat protein“) ist für die Adsorption an die F-Pili der *E. coli* Wirtszelle verantwortlich. Das Gp3-Protein besitzt

eine modulare Struktur aus drei Domänen, die über zwei Glycin-Linker miteinander verbunden sind.

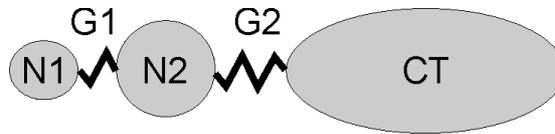


Abbildung 1-1: Domänen-Struktur des Gp3. N1 und N2 bilden die N-terminale Domäne und sind über den Glycin-Linker G1 miteinander verbunden. Der Glycin-Linker G2 stellt die Verbindung zur C-terminalen Domäne CT dar.

Der N-terminale Abschnitt von Gp3 besteht aus den beiden Domänen N1 (67 Aminosäuren) und N2 (131 Aminosäuren), die über einen 19 Aminosäuren umfassenden, glycinreichen Abschnitt miteinander verbunden sind. Die Domänen N1 und N2 bestehen hauptsächlich aus β -Faltblatt-Elementen, besitzen aber auch eine kurze α -Helix in jeder Domäne (Lubkowski et al., 1998). Die Infektion einer Wirtszelle wird durch die Bindung der N2-Domäne an den F-Pilus initiiert (Gray et al., 1981). Danach dringt die N1-Domäne in die Wirtsmembran ein und bewirkt über einen noch unbekanntem Mechanismus den Eintritt der Phagen-DNA in das bakterielle Cytoplasma. Die CT-Domäne (150 Aminosäuren) ist über einen 39 Aminosäuren langen glycinreichen Linker mit N2 verbunden. Sie sorgt für die Verankerung von Gp3 in der Phagenhülle und die Ausbildung der Phagenspitze an einem Ende des Phagenpartikels (Crissman & Smith, 1984). Demnach ist ein funktionelles Gp3 essentiell für die Infektiosität des Bakteriophagen.

1.4.2 Vektortypen

Fremde Proteine können an drei Hüllproteine fusioniert werden: Gp3, Gp8 und Gp6. Die beiden erstgenannten werden mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert, die beim Einbau des Proteins in die innere bakterielle Membran abgespalten wird. In der Regel werden zu untersuchende Proteine an die Regionen von Gp3 und Gp8 fusioniert, die auf der Phagenoberfläche präsentiert werden. Dabei handelt es sich um die N-terminale Domäne von Gp8 (Kishchenko et al., 1991) sowie die N-terminale Domäne aus Gp3 (bestehend aus N1 und N2) (Parmley & Smith, 1988). In manchen Gp3-Vektoren wird die N-terminale Domäne durch das Fremdpeptid ersetzt, so dass man ein Hybrid-Protein erhält, welches zwar in das Virion inkorporiert wird, aber zusätzlich durch ein wt-Gp3 ergänzt werden muss, damit der Phagenpartikel infektiös bleibt (Barbas et al., 1991). Die infektiösen Phagen bestehen demnach aus einem Mosaik von wt-Gp3 und Hybrid-Gp3. Ein ähnlicher Fall liegt vor, wenn ein Peptid größer als acht Aminosäuren in Gp8 insertiert wird. Des Weiteren kann es nur zu einer Infektion und Phagen-Produktion kommen, wenn das Phagengenom zusätzlich durch ein wt-Gp8 supplementiert wird (Felici et al., 1991). Die Klassifizierung der Phagen-Display-

Systeme erfolgt aufgrund der Anordnung der für die Hüllproteine kodierenden Gene (McConnell et al., 1994; Smith, 1993).

Die einfachsten Systeme sind die Typ 3- und Typ 8-Vektoren. Bei einem Typ 3-Vektor existiert ein einziges Phagengenom mit einem einzelnen *gp3*-Gen mit insertierter Fremd-DNA, so dass ausschließlich Hybrid-Gp3-Moleküle insertiert werden. Theoretisch wird das Fremdpeptid also auf allen fünf Kopien von Gp3 präsentiert. Typ-3 Vektoren eignen sich nur für die Präsentation kleiner Peptide, da mit zunehmender Größe des Fremd-Peptides die Funktion von Gp3 gestört wird. Dies führt zur Ausbildung von Phagenpartikeln, die nicht mehr zur Infektion von Bakterienzellen befähigt sind. Entsprechend den Typ 3-Vektoren präsentieren Typ 8-Vektoren ein maximal 8 Aminosäuren umfassendes Fremdpeptid auf jeder Kopie des Hüllproteins Gp8.

Bei den Vektoren des Typs 3+3 bzw. des Typs 8+8 (Abbildung 1-2) tragen Phagemid-Vektoren eine Kopie des *gp3*-Gens bzw. des *gp8*-Gens mit der entsprechend gewünschten Insertion und zusätzlich zum Plasmid-Replikationsursprung und einer Antibiotika-Resistenz den Replikationsursprung filamentöser Phagen. Die Wildtypversion des *gp3*- bzw. *gp8*-Gens befindet sich auf einem Phagengenom, dem sogenannten „Helferphagen“. Dieser wiederum ist defizient bezüglich der Phagen-Replikation. Werden Bakterien, die ein Phagemid tragen, mit einem Helferphagen infiziert, so kommt es zum Zusammenbau von Phagenpartikeln, die eine Mischung aus Wildtyp- und Fusions-Gp3 bzw. Gp8 tragen. Infizieren Phagemid-Virionen nun Bakterienzellen, so erlangen diese die auf dem Phagemid kodierte Antibiotikaresistenz. Besonders der Typ 3+3 hat sich als ein sehr praktikables System erwiesen. Die wichtigste Besonderheit ist die Tatsache, dass die Präsentation des gewünschten Peptids oder Proteins meist monovalent ist. Dies ist vorteilhaft, da die Größe der Gp3-Fusion oft die Infektiosität der Phagen beeinträchtigt.

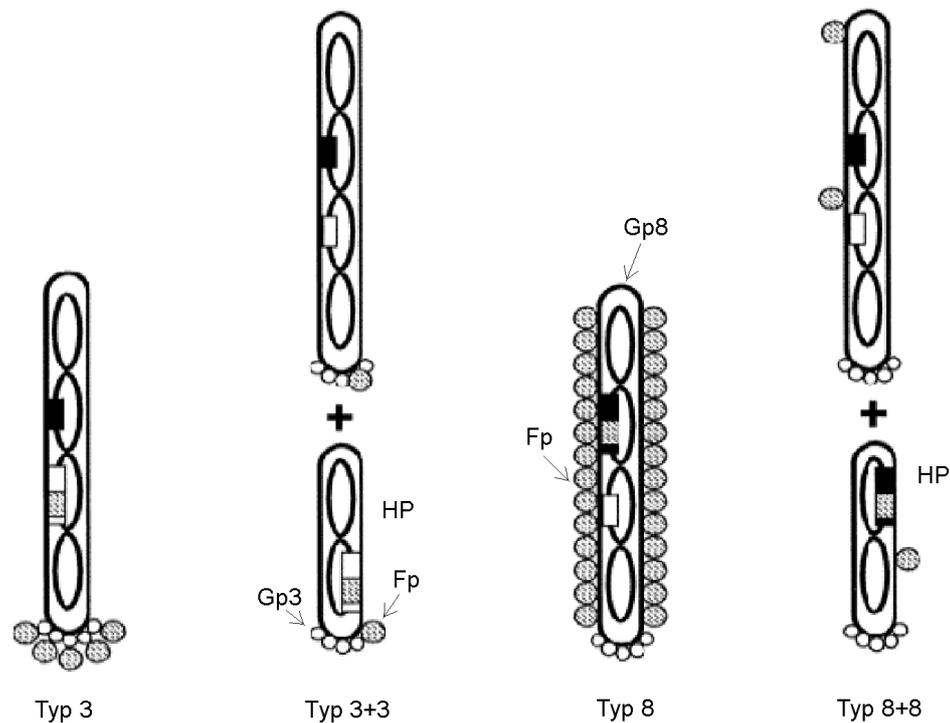


Abbildung 1-2: Vektortypen für Phagen-Display. Je nach Typ wird das Hüllprotein Gp3 oder das Hüllprotein Gp8 für die Mutation verwendet. Fp: Fremdpeptid, HP: Helferphage

Als eine besondere Klasse an Typ 3-Vektoren können die SIP-Vektoren („Selectively Infective Phages“) angesehen werden. Die N-terminale Domäne von Gp3 wird durch ein Fremdpeptid ersetzt, so dass die entstehenden Virionen eine Bakterienzelle nicht infizieren können. Die fehlende N-terminale Gp3-Domäne wird mit einem Adaptermolekül fusioniert. Im Laufe der Selektion können die N-terminale- und C-terminale Domäne aufgrund der Bindung zwischen Fremdpeptid und Adaptermolekül miteinander verbunden werden, so dass ein infektiöses Virion entsteht (Krebber et al., 1995; Krebber et al., 1997). Man kann diese Methode in ähnlicher Weise anwenden, um auf die proteolytische Aktivität eines Proteins hin zu selektieren. In diesem Fall wird das Fremdprotein zwischen die C-terminale und die N-terminalen Domänen von Gp3 inseriert und Phagen mit einem derart veränderten Gp3 werden gebildet. Nach einer *in vitro* Proteolyse des inserierten Proteins sind nur noch solche Phagen infektiös, deren Proteininsertion stabil gegenüber der Proteolyse sind. Dieses System stellt somit eine generelle Methode zur Proteininstabilisierung durch gerichtete Evolution dar, die unabhängig von Bindungseigenschaften oder Enzymspezifitäten des präsentierten Proteins ist (Sieber et al., 1998; Martin et al., 2001).

1.4.3 Anwendungsmöglichkeiten

Die Phagen-Display-Technik wird in den meisten Fällen zur Untersuchung von Protein-Proteinwechselwirkungen eingesetzt. Ziel solcher Experimente ist sehr oft die Entwicklung

von neuen Antikörpern. Dazu wird ein großes Repertoire an verschiedenen Antikörper-Fragmenten auf der Oberfläche filamentöser Phagen präsentiert und auf die Bindung an ein bestimmtes Antigen selektiert. Die erhaltenen Antikörper-Fragmente werden dann aus reinfizierten Zellen isoliert, randomisiert und erneut einer Selektion unterworfen. Dies dient dazu, Fragmente zu finden, die mit einer höheren Affinität und Spezifität an das angebotene Antigen binden als der „Wildtyp“-Antikörper (McCafferty et al., 1990; Marks et al., 1992; Winter et al., 1994). Die Phagen-Display-Technik kann auch dann zur Bereitstellung von Antikörpern genutzt werden, wenn das natürliche Antigen nicht bekannt ist. In dem Fall wird eine Random-Peptid-Bibliothek anhand der Affinität zu einem Antikörper selektiert. Die erhaltenen Peptide werden als antigene Mimetiks des natürlichen Liganden bezeichnet. Sie können nun genutzt werden, um durch Immunisierung Antikörper zu produzieren, ohne dass der natürliche Ligand isoliert werden musste (Motti et al., 1994). Antigene Mimetiks werden vor allem eingesetzt, um synthetische Impfstoffe herzustellen. Solche Selektionen können aber auch dazu verwendet werden, das Antikörper-bindende Epitop auf die wenigen Aminosäuren einzugrenzen, die für die Bindung essentiell sind (Luzzago et al., 1993).

Neben der Antikörper-Entwicklung wird das Phagen-Display auch dazu genutzt, Peptid-Motive zu identifizieren, die bestimmte Liganden binden. Dabei verwendet man Peptidbibliotheken, die Millionen von individuellen Peptiden, und damit einen großen Vorrat an Sequenzen, enthalten. Mit Hilfe solcher Peptid-Bibliotheken wurden Bindungsmotive für Biotin (Kay, 1994), Concanavalin (Scott, 1992), Integrine (Koivunen et al., 1994) und SH3-Domänen (Sparks et al., 1994) identifiziert.

Im Vergleich zu den Arbeiten über Protein-Protein-Wechselwirkungen gibt es nur wenige Arbeiten, in denen Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen mit Phagen-Display-Experimenten untersucht wurden. Allerdings wurde gerade das Zink-Finger-Motiv eingehend mit dieser Technik charakterisiert. Zink-Finger-Motive binden sequenzspezifisch Nukleinsäuren. Das Bindungsmotiv besteht aus einem ca. 30 Aminosäuren langem Abschnitt, in dem zwei invarianten Cysteinreste, zwei invariante Histidinreste und mehrere konservierte hydrophobe Aminosäurereste liegen. Ein Zn^{2+} -Ion wird über vier Koordinationsstellen von Cystein- und/oder Histidinresten des Proteins komplexiert.

Um Peptide zu finden, die spezifisch an eine bestimmte DNA-Sequenz binden, ist es wichtig, die für die DNA-Bindung essentiellen Aminosäurepositionen zu bestimmen. Einen Anhaltspunkt dafür gibt die Röntgenstruktur des Zink-Fingers Zif268, eines regulatorischen DNA-Bindungsproteins der Maus (Pavletich & Pabo, 1991). Nachdem ein aktiver Zink-Finger auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen erfolgreich präsentiert worden war, wurde eine Bibliothek ausgehend von Zif268 konstruiert. Die Aminosäuren der Positionen -1 bis +8 (relativ zu dem ersten Rest der α -Helix, der mit +1 bezeichnet wird) wurden bis auf die konservierten Reste Leucin +4 und Histidin +7 randomisiert, wobei keine Austausche gegen Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Cystein zugelassen wurden, da diese Reste selten an

diesen Positionen auftreten. Die Position +9 wurde in ein Arginin oder Lysin umgewandelt, welche am häufigsten an dieser Stelle vorkommen. Mit dieser Methode konnten in relativ kurzer Zeit diejenigen Aminosäuren identifiziert werden, die für die DNA-Erkennung von Bedeutung sind. Dies sind vor allem die Reste -1, +3 und +6 (Choo & Klug, 1994a; Choo & Klug, 1994b).

Protein-RNA-Wechselwirkungen

Die ersten Experimente zur Untersuchung von Protein-RNA-Wechselwirkungen mit der Phagen-Display-Technik wurden von Laird-Offringa und Belasco (Laird Offringa & Belasco, 1995) beschrieben. Ihnen gelang die erfolgreiche Präsentation und Selektion von Varianten der RNA-bindenden Domäne des spleißosomalen Proteins U1A. Die dabei verwendete U1A-Bibliothek bestand aus nur 512 unterschiedlichen Ausgangsvarianten. An neun U1A-Sequenzpositionen, von denen bekannt war, dass sie mit der U1A-Ziel-RNA interagieren (Jessen et al., 1991), wurde entweder die Wildtyp-Aminosäure zugelassen, oder der Rest, der an dieser Sequenzposition in der hochhomologen RNA-bindenden Domäne des snRibonukleoproteins U2B'' vorliegt. U1A und U2B'' erkennen spezifisch ihre zugehörigen RNA-Elemente. Nach Selektion der Phagenbibliothek konnten vier der neun analysierten Aminosäuren für die Bindung an die U1A-Ziel-RNA verantwortlich gemacht werden. Außerdem wurde ein Variante gefunden, die besser an die U1A-RNA bindet als das Wildtyp-Protein.

Des Weiteren ist die Selektion einer 15mer Peptidbibliothek gegen ein RNA-Element beschrieben. Damit konnten Peptide mit bisher unbekannter Sequenz identifiziert werden, die hochspezifisch an die spleißosomale U1snRNA, bzw. an den Anticodon-Loop der tRNA^{Phe} aus Hefe binden (Agris et al., 1999; Mucha et al., 2001).

Auch bei RNA-bindenden Proteinen ist das Zink-Finger-Motiv bekannt. Der Transkriptionsfaktor TFIIIA aus *Xenopus laevis* enthält neun Zink-Finger, von denen die ersten und die letzten drei nur für die DNA-Bindung verantwortlich sind, während die mittleren drei Zink-Finger das Gen der 5S rRNA und die 5S rRNA selbst binden können (Mattaj, 1993). Um Motive zu finden, die besonders affin an RNA binden, wurde eine Bibliothek ausgehend von Zink-Finger 4 aus TFIIIA konstruiert (Friesen & Darby, 1997). Dabei wurden die Aminosäuren zwischen den Positionen -2 und +10 der α -Helix mit Ausnahme der konservierten Reste Histidin +7 und Leucin +4 vollständig randomisiert und die Bibliothek auf die Bindung an 5S rRNA und an das RRE-IIB-RNA-Element aus HIV-1 selektiert. Für beide RNA-Elemente wurden Peptide gefunden, die sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* hochaffin an die RNA binden (Friesen & Darby, 1998; Laird-Offringa & Belasco, 1998). Ausgehend von diesen gefundenen Sequenzen wurden Zink-Finger konstruiert, die eine hochaffine Bindung an ein gewünschtes RNA-Target aufweisen (Friesen & Darby, 2001). Eine mögliche Anwendung solcher selektierter RNA-bindender Peptide liegt in der

Entwicklung sequenzspezifischer Transkriptionsregulatoren für die Gen-Therapie und in der Konstruktion von Inhibitoren der Replikation und Expression von RNA-Viren.

1.5 Das Humane Immundefizienz Virus HIV-1

Das menschliche Immundefizienzvirus (HIV) ist der Verursacher des erworbenen Immunschwächesyndroms („Acquired Immunodeficiency syndrome“, AIDS). Während in Zentralafrika und den meisten anderen Gebieten der Erde der Typ 1 (HIV-1) überwiegt, dominiert bei Infektionen in Westafrika der Typ 2 (HIV-2). HIV wurde als ein zu der Unterfamilie der Lentiviren gehöriges Retrovirus identifiziert (Barre-Sinoussi et al., 1983; Popovic et al., 1984). Lentiviren verursachen Krankheiten mit langer Inkubationszeit und langwierigem Verlauf. So kann bei einer HIV-Infektion zwischen der Nachweisbarkeit der Antikörper im Blut und dem Ausbruch der Symptome von AIDS ein Zeitraum von wenigen Monaten bis zu mehr als 10 Jahren vergehen (Levy, 1993).

Das HIV-Genom entspricht dem allgemeinen Aufbau eines retroviralen Genoms (Modrow & Falke, 1997). Genau wie andere Retroviren besitzt HIV drei Gene, die für die Strukturproteine des viralen Kerns, die Hüllproteine und die für die Replikation des Virusgenoms notwendigen Enzyme kodieren: *gag*, *env* und *pol*. Des Weiteren kodiert das HIV-Genom für die regulatorischen Gene *tat* und *rev*, die für die Virusreplikation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* essentiell sind und noch für vier weitere, die sogenannten akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu, welche für die Virusreplikation *in vitro* nicht essentiell sind, aber bei der Ausbildung pathogener Effekte *in vivo* eine entscheidende Rolle spielen (Subramanian et al., 1994).

Der Replikations-Zyklus von HIV wird in zwei verschiedene Phasen unterteilt (Abbildung 1-3). Während einer frühen Prä-Integrationsphase infiziert das Virus die Zelle, die reverse Transkription wird durchgeführt und das provirale Genom in den Zellkern transportiert und ins Wirtszellgenom integriert. In der darauffolgenden Post-Integrationsphase exprimiert das integrierte Provirus seine Gene, das Virus assembliert sich, reift und wird ausgeschleust.

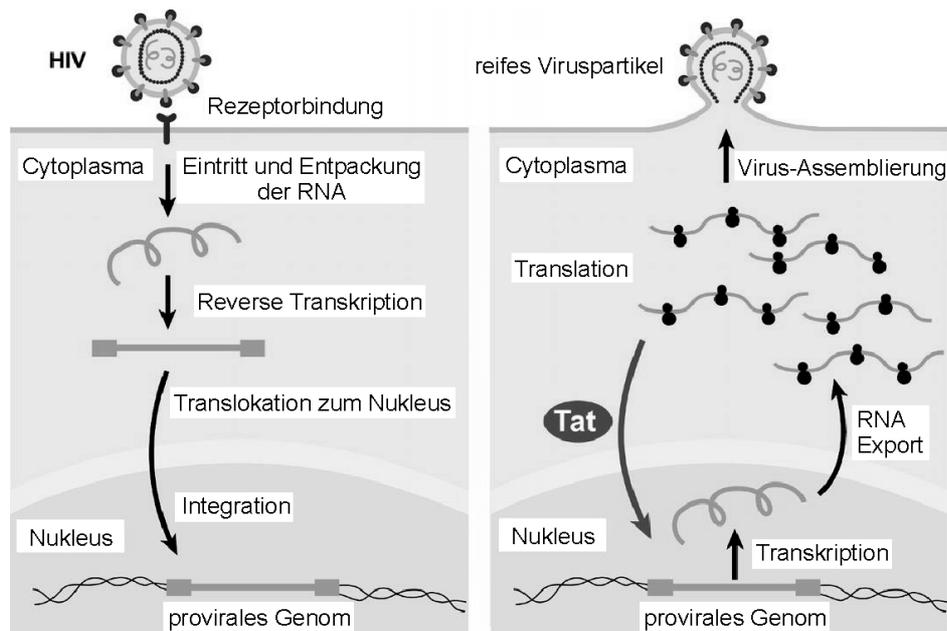


Abbildung 1-3: Replikationszyklus von HIV-1. Links: Frühes Stadium bis zur Integration des proviralen Genoms. Rechts: Spätes Stadium bis zur Virus-Assemblierung (nach Karn, 1999).

1.6 Das Tat-Protein aus HIV-1

Das Tat-Protein („trans-activator of transcription“) ist eines der beiden regulatorischen Proteine von HIV-1. Es bindet an ein RNA-Element im 5'-nichttranslatierten Bereich der mRNA, das als TAR (trans activation responsive element) bezeichnet wird. Dadurch kommt es zu einer Steigerung der Elongationsrate durch den eukaryotischen RNA-Polymerase-II-Komplex (Dayton et al., 1986; Fisher et al., 1986). Für die Funktion von Tat ist es essentiell, dass die TAR-RNA eine stabile Haarnadelschleifenstruktur einnimmt (Muesing et al., 1987) und in der korrekten Orientierung vorliegt (Cullen, 1986). Ohne Tat werden nur kurze RNA-Moleküle mit einer Länge von ungefähr 60 Nukleotiden gebildet, wobei die Transkriptionsrate nicht durch Tat beeinflusst wird (Kao et al., 1987). Nach der Zugabe von Tat wird eine durchgängige Transkription beobachtet. Tat liefert damit das erste Beispiel für die Regulation der viralen Genexpression durch die Kontrolle der Elongation der RNA-Polymerase II, wobei ebenfalls ein Zusammenhang mit der Initiation der Transkription nicht ausgeschlossen wird.

1.6.1 Die Struktur von HIV-Tat

Tat wird von zwei Exons kodiert und wurde nach seiner Synthese sowohl im Nucleolus als auch im Nucleus infizierter Zellen nachgewiesen (Hauber et al., 1989; Siomi et al., 1990). Das Protein besteht aus 86 bis 115 Aminosäuren, wobei die 72 Aminosäuren des ersten Exons bereits die volle Transaktivierungsaktivität aufweisen (Cullen, 1986). Die Größe des zweiten

Exons ist in den verschiedenen HIV-Isolaten variabel. Das Tat-Protein kann in fünf verschiedene funktionelle Sequenzdomänen eingeteilt werden (Abbildung 1-4).



Abbildung 1-4: Die Domänen- und Exonstruktur von HIV- Tat

Die N-terminale Domäne von Rest 1 bis 21 ist eine saure, prolinreiche Sequenzdomäne. Mutationen in diesem Bereich inaktivieren Tat in Bezug auf seine Transaktivierungsaktivität (Sadaie et al., 1988a; Sadaie et al., 1988b; Ruben et al., 1989). Dabei scheinen nicht alle Proline für die Transaktivierung essentiell zu sein (Garcia et al., 1989).

Als nächstes folgt eine cysteinreiche Domäne (Aminosäuren 22 bis 31). Dieser Sequenzabschnitt ist an der Bindung von Cyclin T1 (Wei et al., 1998) und eventuell an der Bindung zweiwertiger Metallionen beteiligt (Frankel et al., 1988). Die cysteinreiche Region umfasst fünf Cysteinreste. Alle dokumentierten Mutationen dieser Reste führen mit der Ausnahme einer C31S-Mutation zu einem fast vollkommenen Verlust der Transaktivierungsaktivität (Garcia et al., 1988).

An die cysteinreiche Domäne schließt sich die Kernregion (Aminosäuren 32 bis 48) an. Diese Region ist zwischen den bekannten Tat-Proteinen stark konserviert und trägt zur Spezifität der Bindung von Tat an die TAR-RNA bei (Churcher et al., 1993). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Tat über die Kernregion Wechselwirkungen mit dem TATA-Box-Bindungsprotein (TBP), der zentralen Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIID, eingeht (Kashanchi et al., 1994). Für diese Wechselwirkung scheint Lysin 41 essentiell zu sein, da eine Mutation dieses Aminosäurerestes zu einem Verlust der Transaktivierungsaktivität führt (Kuppuswamy et al., 1989). Die ersten drei Sequenzdomänen von HIV-Tat wurden als minimale Transaktivierungsdomäne beschrieben (Carroll et al., 1991; Derse et al., 1991).

Die vierte Sequenzdomäne umfasst zehn Aminosäuren (Reste 49 bis 58). Mit Ausnahme eines Glutamins und eines Prolins sind diese Reste alle basisch, der Bereich stellt ein „arginine rich motif“ (ARM, Kap. 1.2) dar. Mutationsstudien zeigten, dass die basische Domäne essentiell für die Transaktivierungsaktivität von Tat ist, aber einzelne Aminosäureaustausche keinen großen Einfluss auf die Aktivität haben (Hauber et al., 1989; Ruben et al., 1989). Allerdings ist Arginin 52 hochkonserviert in allen bekannten Tat-Proteinen. Es trägt durch die Ausbildung eines Wasserstoffbrücken-Netzwerkes zum Phosphatrückgrat der TAR-RNA zu einem großen Teil zur Bindungsspezifität von Tat bei (Calnan et al., 1991b; Tao & Frankel, 1992). Darüber hinaus enthält die basische Domäne die Kernlokalisationssequenz (Siomi et al., 1990; Hauber et al., 1989; Endo et al., 1989).

Das erste Exon wird durch eine glutaminreiche Sequenz (Aminosäuren 59 bis 72) abgeschlossen, die ebenfalls einen gewissen Beitrag zur Spezifität der Tat-TAR-Bindung liefert (Churcher et al., 1993).

Vom zweiten Exon wird die C-terminale Sequenzdomäne von Tat (Aminosäuren 73 bis 86) kodiert. Diese Domäne scheint für die Transaktivierungsaktivität nicht essentiell zu sein, da ein Verlust des zweiten Exons keine Auswirkung auf die Replikation des Virusgenoms hat (Cullen, 1990; Sodroski et al., 1985a). In diesem Sequenzabschnitt enthält Tat eine RGD-Sequenz, die möglicherweise als Zelladhäsionssignal dient und die Bindung von Tat an zelluläre Integrine vermitteln soll (Brake et al., 1990). Nach der Bindung an Säugerzellen kann Tat von diesen aufgenommen werden und liegt dann im Zellkern vor (Frankel & Pabo, 1988). Außerdem konnte ein Austausch von Tat zwischen benachbarten Zellen beobachtet werden (Helland et al., 1991).

1.6.2 Steigerung der Elongation der Transkription durch Tat

Die Transaktivierungsaktivität von Tat beruht auf der Bindung an das HIV-TAR-Element. Die HIV-TAR-RNA Haarnadelschleifenstruktur erstreckt sich von Nukleotid +1 bis +59. Deletionsstudien zeigten, dass die Region von +19 bis +42 ein Minimalelement darstellt, das für eine Transaktivierung durch Tat *in vivo* ausreichend ist (Garcia et al., 1989; Hauber & Cullen, 1988). Diese Region weist einen Stamm mit uracilreicher Ausbauchung und einer Hexanukleotidschleife auf (Abbildung 1-5).

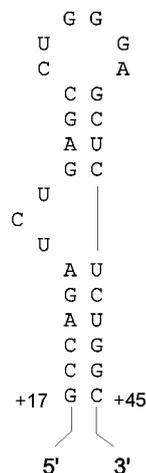


Abbildung 1-5: Minimalelement der HIV-1-TAR (nach Karn et al., 1994)

Mutationen oder Deletionen im Bereich der uracilreichen Ausbauchung führen zum Verlust der Transaktivierungsaktivität von Tat, da dieses weniger affin oder gar nicht mehr an TAR binden kann (Cordingley et al., 1990; Dingwall et al., 1989; Dingwall et al., 1990). So führt z.B. eine Mutation der konservierten Base Uracil 23 zu einem Verlust der Spezifität (Gait & Karn, 1993). Die Hexanukleotid-Schleife der TAR-RNA ist nicht direkt an der Bindung von

Tat beteiligt, sondern für die Bindung von zellulären Kofaktoren, wie z.B. Cyclin T1, notwendig (Jones & Peterlin, 1994; Cullen, 1993).

Die Interaktion von Tat mit der TAR-RNA wird durch ein ARM vermittelt (Kap. 1.2). Tat kontrolliert durch die Bindung an TAR einen frühen Schritt der Transkriptions-Elongation, bei dem die C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II durch eine Tat assoziierte Kinase (TAK) phosphoryliert wird (Herrmann & Rice, 1993; Herrmann & Rice, 1995; Jones, 1997). Diese setzt sich aus Cdk9 und Cyclin T1 zusammen. Dabei handelt es sich um einen zellulären Faktor, welcher die Erhöhung der Spezifität und Affinität der Bindung von Tat an TAR durch die Bildung eines Tat-Cyclin T-Komplexes bewirkt (Wei et al., 1998).

Für HIV-1 wurden verschiedene Transaktivierungsmechanismen diskutiert. Inzwischen geht man von folgendem Modell aus: Zunächst wird die Transkription über zelluläre Transkriptionsfaktoren am 5'-LTR durch die RNA-Polymerase II initiiert. Dieser gebildete Transkriptionskomplex ist im Gegensatz zur Situation bei zellulären Promotoren nicht stabil. Die RNA-Polymerase II verlässt den Promotor und die TAR-DNA wird transkribiert. Nach Ausbildung der TAR-RNA pausiert die RNA-Polymerase II und verlässt das HIV-1-LTR nicht. Die naszierende TAR-RNA interagiert mit der RNA-Polymerase II und kann, wenn Tat in der Zelle vorhanden ist, den Tat-Cyclin T-TAK-Komplex zum HIV-1-LTR rekrutieren. Der TAK-Komplex hyperphosphoryliert dann die CTD der RNA-Polymerase II, TAR dissoziiert von dem Proteinkomplex ab und die Transkriptionselongation startet, wobei Tat Bestandteil des Transkriptionskomplexes wird (Jeang, 1998; Keen et al., 1997). Der Übergang von einer nicht-prozessiven zu einer prozessiven und effizienten Transkription ist in Abbildung 1-6 dargestellt.

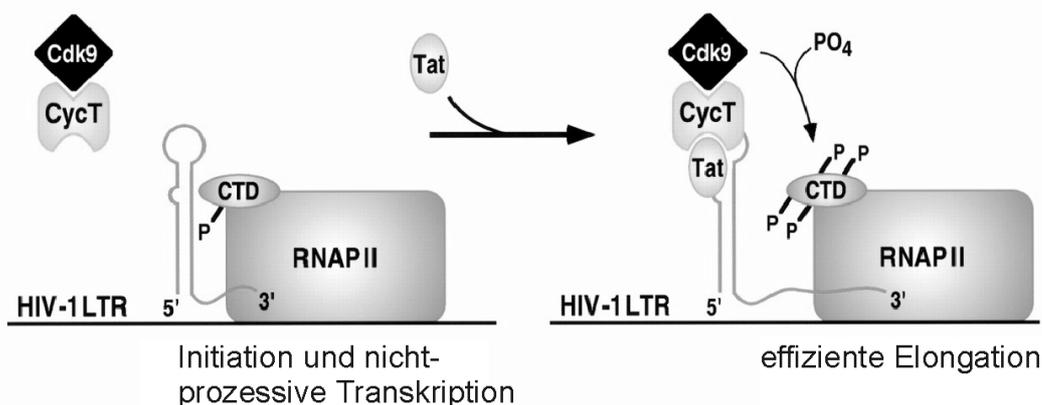


Abbildung 1-6: Modell für die Funktion von Tat innerhalb des Transkriptions-Prozesses. Die Transkription wird am HIV-1 LTR initiiert und pausiert nach der Ausbildung des TAR-Elements, wenn kein Tat zur Verfügung steht. Bindet Tat in einem Komplex mit CDK9 und Cyclin T an die RNA, so wird die CTD der RNA-Polymerase II hyperphosphoryliert und es kommt zu einer prozessiven Transkription (nach Emerman & Malim, 1998).

2 Ziel der Arbeit

Für das Transaktivatorprotein Tat des humanen Immunschwächevirus (HIV-1) existiert ein etabliertes Phagen-Display-System (Hoffmann & Willbold, 1997). Dabei handelt es sich um ein Modellsystem zur Untersuchung von Protein-RNA-Wechselwirkungen. Für die Bindung von Tat an das von ihm erkannte RNA-Element (TAR-RNA) wird zu einem großen Teil die argininreiche Sequenzdomäne verantwortlich gemacht. Zusätzlich wird die Affinität und Spezifität der RNA-Bindung von HIV-Tat durch den zellulären Kofaktor Cyclin T1 verstärkt.

In dieser Arbeit sollte zunächst das Tat-TAR-Phagen-Display-System durch die Gegenwart von Cyclin T1 zu einem ternären System erweitert werden. Dieses System sollte dann daraufhin überprüft werden, ob es die *in vivo* und *in vitro* gefundenen Funktionen von Cyclin T1 widerspiegeln kann. Die Funktionalität des Systems sollte durch die Bestimmung der Bindungseigenschaft verschiedener Tat-Varianten in Anwesenheit und in Abwesenheit von Cyclin T1 überprüft werden. Außerdem sollte die Spezifität und der Einfluss der gesamten basischen Sequenzdomäne von HIV-Tat auf die Tat-TAR-Wechselwirkung untersucht werden.

Um Aufschluss über die Rolle einzelner Aminosäurereste auf die Tat-TAR-Bindung zu erlangen, sollten anschließend voneinander unabhängige Tat-Phagenbibliotheken durch die Randomisierung der Reste R49, K50, K51, K52 bzw. R53, R55, R56, R57 konstruiert werden. Aus diesen Bibliotheken sollten Tat-Varianten selektiert werden, die unter den entsprechenden Selektionsbedingungen an TAR-RNA binden.

Die so erhaltenen Tat-Varianten sollten auf folgende Eigenschaften charakterisiert werden: Zum einen sollte die Bindung der selektierten Tat-Varianten an TAR-RNA *in vitro* nachgewiesen werden und zum anderen sollte die Transaktivierungsaktivität *in vivo* bestimmt werden. Des Weiteren sollte die Lokalisation von HIV-Tat in eukaryoten Zellen überprüft werden.

Unabhängig von der Tat-Funktion sollte eine 12mer-Peptidbibliothek unter verschiedenen Bedingungen auf die Bindung an HIV-TAR-RNA selektiert werden. Durch die statistische Betrachtung der Zusammensetzung der Peptide sollte untersucht werden, ob eine Präferenz für Aminosäuren mit bestimmten chemischen Eigenschaften vorliegt. Aus diesen Selektionen erhaltene Peptide sollten dann auf ihre Affinität und Spezifität zur TAR-RNA hin untersucht werden.

3 Materialien

3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. Angegeben ist jeweils der Name, der Genotyp und die Referenz.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYAargF</i>)U169, ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, k ⁻	(Jessee, 1986)
<i>E. coli</i> ER2738	F', <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , Δ (<i>lacZ</i>)M15zzf::Tn10(Tet ^R), <i>fhuA2</i> , <i>glnV</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>thi-1</i> , Δ (<i>hsdS-mcrB</i>)5	New England Biolabs, Frankfurt
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ZDM15, <i>tn10</i> (<i>tet</i> ^r)]	(Bullock et al., 1987)
<i>E. coli</i> BL21 RIL	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i>	(Studier et al., 1990)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , λ (DE3)	(Grodberg & Dunn, 1988)

3.2 Phagen, Phagemide und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Phagen, Phagemide und Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Phagen, Phagemide und Plasmide. Angegeben ist der in dieser Arbeit verwendete Name, die selektierbare Antibiotikaresistenz, der Verwendungszweck und die Quelle für jeden Vektor.

Vektor	Resistenz	Eigenschaft	Referenz/Quelle
VCSM	Kan	Helferphage	Stratagene, Heidelberg
pAK200	Cm, Tet	Typ 3+3, <i>gp3ss</i>	Krebber et al. (1997)
pAK- <i>tat</i> -wt(E/E)	Cm	trägt HIV-Tat-Variante und 2 <i>EcoO109I</i> -Schnittstellen	S. Hoffmann, Univ. Bayreuth, LS Biopolymere

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Phagen, Phagemide und Plasmide.
 Angegeben ist der in dieser Arbeit verwendete Name, die selektierbare Antibiotikaresistenz, der Verwendungszweck und die Quelle für jeden Vektor.

Vektor	Resistenz	Eigenschaft	Referenz/Quelle
pAK- <i>tat</i> -mtRRRR	Cm	trägt HIV-Tat-Variante	S. Hoffmann, Univ. Bayreuth, LS Biopolymere
pAK- <i>tat</i> -mtRKKR	Cm	trägt HIV-Tat-Variante	diese Arbeit
pAK- <i>tat</i> -mt8bas	Cm	trägt HIV-Tat-Variante	diese Arbeit
pGEX-4T-2	Ap	prokaryotischer Expressionsvektor	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
pcDNA3	Ap, Neo	eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen, Leek, Niederlande
pcDNA3.1-CT-GFP	Ap, Neo	eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen, Leek, Niederlande
pGL-HIV-LTR	Ap	eukaryotisches Reporterplasmid	S. Hoffmann, Univ. Bayreuth, LS Biopolymere
pRL-TK	Ap	eukaryotisches Reporterplasmid	Promega, Madison, USA
pAK- <i>tat</i> -wt - Amp(E/E)	Cm, Ap	trägt Ap- Kasette	S. Hoffmann, Univ. Bayreuth, LS Biopolymere
pAK- <i>tat</i> -wt-C31S- Amp(E/E)	Cm, Ap	trägt Ap- Kasette	S. Hoffmann, Univ. Bayreuth, LS Biopolymere
pHis-hCycT1(272Δ)	Ap	trägt Cyclin T 272Δ	S. Hoffmann, Univ. Bayreuth, LS Biopolymere
pGEX- <i>tat</i> - mt8bas(<i>Sfi</i> I/ <i>Sfi</i> I)	Ap	trägt HIV-Tat-Variante	diese Arbeit
pcDNA- <i>tat</i> - mt8bas(<i>Sfi</i> I/ <i>Sfi</i> I)	Ap, Neo	trägt HIV-Tat-Variante	diese Arbeit
pcDNA- <i>tat</i> - mt8bas(<i>Sfi</i> I/ <i>Sfi</i> I)- GFP	Ap, Neo	trägt HIV-Tat-Variante	diese Arbeit
Ph.D.-12	-	trägt Bibliothek aus 12 Aminosäuren	New England Biolabs, Frankfurt

3.2.1 Das pAK-System

Das verwendete pAK-System (Krebber et al., 1996a) stellt einen Phagendisplay-Vektor des Typs 3+3 (Kap. 1.4.2) dar, d. h. es liegen zwei Kopien des *gp3*-Gens auf zwei getrennten Genomen vor. Auf dem Helferphagen liegt das wt-Gp3 vor, das rekombinante Gp3 wird von einem Phagemid, dem pAK-Vektor, kodiert. Ein Phagemid ist ein spezielles Plasmid, das einen Replikationsursprung für die Plasmidreplikation und einen für die Replikation des Phagen-genoms besitzt. Bei der Vermehrung werden in diesem System Phagenpartikel produziert, die nur eine oder höchstens zwei Kopien des Fusions-Gp3-Protein tragen und so die volle Infektosität behalten.

In pAK-Vektoren ist durch das Einfügen eines starken Transkriptionsterminators vor die Promotorregion des *gp3*-Fusionsgens die Hintergrundexpression vor der eigentlichen Induktion stark minimiert. Antikörper-Varianten, welche schon in geringen Mengen toxisch auf Bakterienzellen wirken, ließen sich erfolgreich als Gp3-Fusion mit pAK-Vektoren selektionieren (Krebber et al., 1996a). Das *gp3*-Gen liegt in stark verkürzter Form vor und beginnt erst bei Aminosäure 250 im Vorläuferprotein (*gp3ss*, *gp3* „super short“). Somit sind die im vollständigen Gp3 enthaltenen repetitiven Glycinlinker sowie sechs der insgesamt acht Cysteinreste in Gp3ss nicht mehr vorhanden. In

Abbildung 3-1 sind die wichtigsten genetischen Marker eines pAK-Vektors aufgeführt.

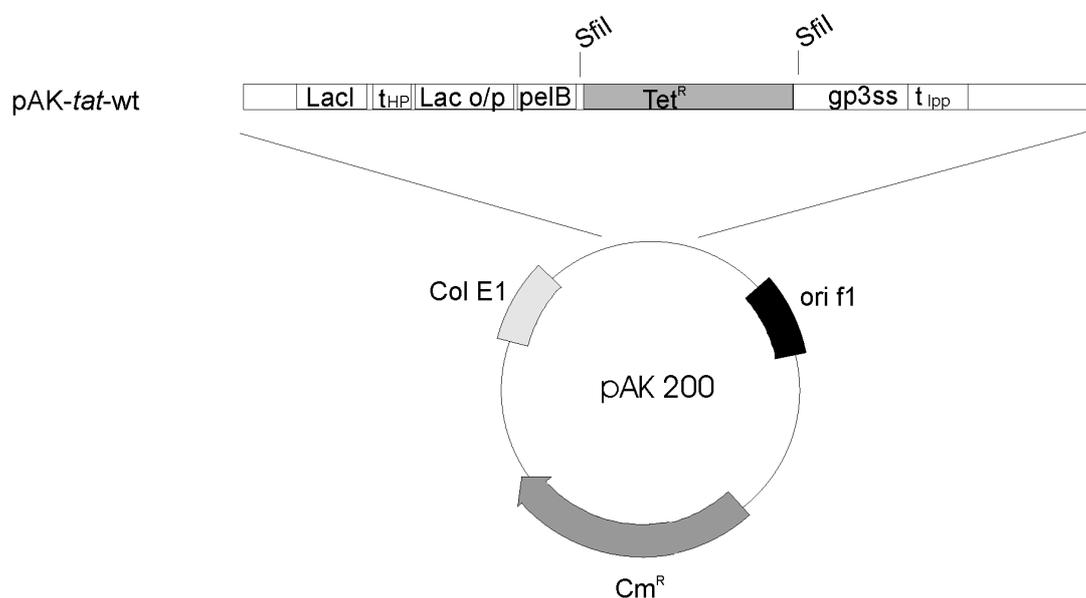


Abbildung 3-1: Phagendisplay-Vektor der pAK-Serie. Die Expressionskassette des Vektors bestehend aus LacI, einem starken Terminator (t_{HP}), der lac Promotor-/Operatorregion, einer modifizierten pelB-Signalsequenz mit *SfiI*-Erkennungsstelle, dem Gen für Tetracyclin-Resistenz sowie einem verkürzten Gen für das Gp3-Protein (gp3ss) und einem weiteren Terminator wurde vergrößert dargestellt. Dabei erleichtert die tet-Resistenz-Kassette die Überwachung der Restriktion des Phagemids mit *SfiI*. Die Klonierung über die beiden *SfiI*-Erkennungsstellen verläuft unidirektional, da unterschiedliche Überhänge generiert werden. Dargestellt sind pAK-tat-wt und pAK200.

3.2.2 Ph.D 12 Phagenbibliothek

Bei der Ph.D 12 Phagenbibliothek handelt es sich um ein kommerziell erhältliches System (New England Biolabs, Frankfurt) eines Typ-3 Vektors (Kap. 1.4.2). An das *gp3*-Gen ist N-terminal direkt nach der Signalsequenz eine Bibliothek aus 12 randomisierten Aminosäuren inseriert. Die Bibliothek besteht aus $1,9 \times 10^9$ unabhängigen Klonen und ist so amplifiziert und konzentriert, dass in einem Volumen von $10 \mu\text{l}$ durchschnittlich 55 Kopien einer jeden Sequenz enthalten sind. Die genaue Zusammensetzung der Bibliothek kann dem entsprechenden Handbuch entnommen werden (Biolabs,).

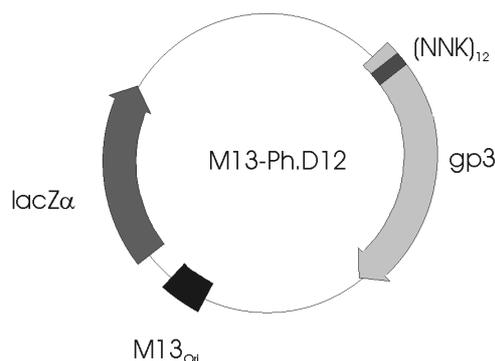


Abbildung 3-2: Genom des M13-Phagen mit inserierter Bibliothek. Eine $(\text{NNK})_{12}$ -Bibliothek (N: beliebige Base, K: G oder T) ist über die Schnittstellen *KpnI* und *EagI* direkt hinter die Signalsequenz von *gp3* am N-Terminus kloniert

3.3 Oligonukleotide

In den folgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Alle Oligonukleotide wurden entweder von BioTeZ (Berlin) oder Sigma ARK(Deisenhofen) bezogen.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Oligonukleotide, die für die Klonierung von pAK-Varianten eingesetzt wurden. Aufgelistet ist jeweils der Name, die Sequenz und die Länge.

Name	Sequenz	Länge
PAKlib-RKKR5(+)	5'- Phosphat-ggc ctc gga att tct tac ggt nnk nnk nnk nnk cgt cag cgt cgt cgt ccg tct cag ggt ggt caa act cat cag- 3'	75mer
PAKlib-RKKR3(+)	5'- Phosphat-gtc ctg atg agt ttg acc acc ctg aga cgg acg acg acg ctg acg iii iii iii iii acc gta aga aat tcc gag- 3'	75mer
pAKlib-RRRR5(+)	5'-Phosphat-ggc ctc gga att tct tac ggt cgt cgt aag aaa cgt nnk cag nnk nnk nnk ccg tct cag ggt ggt caa act cat cag- 3'	75mer
pAKlib-RRRR3(-)	5'-Phosphat-gtc ctg atg agt ttg acc acc ctg aga cgg iii iii iii ctt iii ttt ctt acg acc gta aga aat tcc gag- 3'	75mer

Tabelle 3-3ff: Zusammenfassung der Oligonukleotide, die für die Klonierung von pAK-Varianten eingesetzt wurden. Aufgelistet ist jeweils der Name, die Sequenz und die Länge. N: beliebige Base, K: G oder T, I: Inosin

Name	Sequenz	Länge
pAKmt8bas-5(+)	5'- ggc ctc gga att tct tac ggt gcg gcg gcg gcg cag gcg gcg gcg ccg tct cag ggt ggt caa act cat cag- 3'	75mer
pAKmt8bas-3(-)	5'- gtc ctg atg agt ttg acc acc ctg aga cgg cgc cgc cgc ctg cgc cgc cgc cgc acc gta aga aat tcc gag- 3'	75mer
pAKmtRKKR-5(+)	5'-Phosphat-ggc ctc gga att tct tac ggt gcg gcg gcg gcg cgt cag cgt cgt cgt ccg tct cag ggt ggt caa act cat cag- 3'	75mer
pAKmtRKKR-3(-)	5'- Phosphat-gtc ctg atg agt ttg acc acc ctg aga cgg acg acg acg ctg acg cgc cgc cgc cgc acc gta aga aat tcc gag- 3'	75mer
PCRwt(-)	5'- acg acg acg ctg acg- 3'	15mer
PCR8bas(+)	5'- cgg aat ttc tta cgg tgc ggc g	22mer
pAKseq-pelB(+)	5'- cct att gcc tac ggc agc-3'	18mer
PAKseq-gp3(-)	5'-ccc tta tta gcg ttt gcc-3'	18mer

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Oligonukleotide, die für die Umklonierung von pAK-Varianten eingesetzt wurden. Aufgelistet ist jeweils der Name, die Sequenz und die Länge.

Name	Sequenz	Länge
HIV-tat-SfiI-TA-N(+)	5'- acc atg gcg gcc cag ccg gcc atg gcg-3'	27mer
HIV-tat-SfiI-TA-C(-)	5'- cgg ccc ccg agg cct gtt tcg-3'	21mer
HIV-tat-BamHI-SfiI(+)	5'- gag gag ggg atc cac cat ggc cca gcc ggc cat ggc gc-3'	38mer
HIV-tat-NotI-SfiI(-)	5'- gag gag ggc ggc cgc aat ggc ccc cga ggc ctg ttt cgg-3'	39mer
HIV-tat-GDQF(+)	5'- ctt acg gtg ggg atc agt ttc gtc agc-3'	27mer
HIV-tat-PMQD(+)	5'- ctt acg gtc cta tgc agg atc gtc agc-3'	27mer

Tabelle 3-5: Zusammenfassung der Oligonukleotide, die für die Sequenzierung eingesetzt wurden.
Aufgelistet ist jeweils der Name, die Sequenz und die Länge.

Name	Sequenz	Länge
GFP-Rev(-)	5'- ggg taa gct ttc cgt atg tag c-3'	22mer
T7-Prom(+)	5'- taa tac gac tca cta tag gg-3'	20mer
SP6(+)	5'- gat tta ggt gac act ata g-3'	19mer
pGEX(+)	5'-ggg ctg gca agc cac gtt tgg tg-3'	23mer
M13-Seq(-)	5'-cta ccg taa cac tga gtt tcg-3'	21mer

3.4 Nährmedien, Puffer und Lösungen

3.4.1 Nährmedien

Die Nährmedien wurden nach Sambrook et al., 1989 hergestellt.

Flüssigmedien hatten die nachfolgenden Zusammensetzungen. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien noch 15 g Agar/l und für Top-Agar 7 g Agar/l zugesetzt. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren (20 min, 1,2 bar, 121 °C, Autoklav Typ Matachana HST 250, Zirbus, Osterode).

LB-Medium (Luria Bertani): 10 g Trypton, 5 g Hefe, 10 g NaCl mit H₂O bidest. ad 1000 ml

SOC-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefe, 0,5 g NaCl, 10 ml KCl-Lösung (250 mM) mit H₂O bidest. ad 1000 ml; Vor dem Autoklavieren wurde der pH mit 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt. Kurz vor Gebrauch wurden 200 µl Glukose (1 M) und 50 µl MgCl₂ (2 M) pro 10 ml SOC sterilfiltriert (0,22 µm) zugegeben.

2xYT-Medium (konz.): 16 g Trypton, 10 g Hefe, 5 g NaCl mit H₂O bidest. ad 800 ml

TB-Medium (Terrific Broth): 12 g Trypton, 24 g Hefe, 4 ml Glycerin mit H₂O bidest ad 900 ml; 2,31 g KH₂PO₄, 12,54 g K₂HPO₄ mit H₂O bidest. ad 100 ml; beide Lösungen wurden autoklaviert und nach dem Abkühlen zusammengegeben.

DMEM-Medium: Für die Anzucht von eukaryotischen Zellen kam „Dulbecco modified Eagle medium“ mit Acetyl-Alanin-Glutamin mit folgenden Zusätzen zum Einsatz: 10 % fetales Kälberserum, 10 mg/ml Gentamycin

Antibiotika wurden je nach Bedarf in folgenden Konzentrationen sterilfiltriert (0,22 µm) zugegeben:

Ampicillin (Ap: 200 µg/ml in H₂O), Kanamycin (Kan: 50 µg/ml in H₂O), Chloramphenicol (Cm: 34 µg/ml in 100 % Ethanol) und Tetracyclin (Tet: 20 µg/ml in 50 % Ethanol).

Die Induktion von *lac*-Promotoren erfolgte durch Zugabe von IPTG in Endkonzentrationen von 1 mM. Zur Durchführung eines „Blau-Weiß-Screenings“ wurde den Agarplatten X-Gal (Endkonzentration von 40 µg/ml) und IPTG (Endkonzentration von 50 µg/ml) zugegeben.

3.4.2 Puffer

TE: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

TAE: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0

TG: 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, pH 8,8

TBS: 25 mM Tris/HCl, 0,9 % NaCl, pH 7,5

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Bindungspuffer: 10 mM Tris/HCL, 100 mM NaCl, pH 7,5

5x Phosphat-Puffer: 120 mM Na₂HPO₄, 100 mM KH₂PO₄, pH 7,0

3.4.3 Lösungen

PEG-Lösung: 20 % Polyethylenglykol 6000, 2,5 M NaCl

APS: frische Lösung von 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H₂O

RNase-Lösung: 10 mg/ml RNase A in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl für 10 min auf 100 °C erhitzen und langsam auf RT abkühlen

3.5 Enzyme und Proteine

Die folgende Aufzählung beinhaltet die Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Proteine.

Amersham Biosciences (Freiburg): Protein-Standard („low-molecular-weight“, Phosphorylase B: 97 kDa, BSA: 66 kDa, Ovalbumin: 45 kDa, Carboanhydrase: 31 kDa, Trypsininhibitor: 20,1 kDa, Lysozym: 14,4 kDa), Roche (Mannheim): DNase I, Complete-Proteinaseinhibitor, GibcoBRL (Eggenstein): T4-DNA-Ligase (hc), MBI Fermentas (Vilna, Litauen): *Eco*109I (*Dra*II), *Bam*HI, *Not*I, *Taq*-DNA-Polymerase, T4-DNA-Polymerase, T4-Polynukleotidkinase, New England Biolabs (Frankfurt/Main): *Sfi*I, Vent-DNA-Polymerase, Promega (Madison, USA): *rRN*asin, Sigma (Deisenhofen): Lysozym, Bio-Rad (München): Protein-Standard („low-range“, Phosphorylase B: 97,4 kDa, BSA: 66,2 kDa, Ovalbumin: 45,0 kDa, Carboanhydrase: 31,0 kDa, Trypsininhibitor: 21,5 kDa, Lysozym: 14,4 kDa)

Synthetische Peptide mit Fluorescein-Markierung wurden von Jerini (Berlin) bezogen.

Für Gelretardationsexperimente stand gereinigtes humanes Cyclin T1 (aa 1-272) vom Lehrstuhl für Biopolymere, Universität Bayreuth (Dr. S. Hoffmann) zur Verfügung.

3.6 Nukleotide und Nukleinsäuren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide (siehe Tabelle 3-3 und 3-4) stammen von den Firmen BioTeZ (Berlin) und Sigma ARK (Deisenhofen).

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ wurde von Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen.

Am 5'-Ende biotinylierte HIV-TAR-RNA mit der Sequenz 5'-bio-gcc aga ucu gag ccu ggg agc ucu cug gc-3' wurde von Eurogentec (Seraing, Belgien) erworben. Unmarkierte, mittels *in vitro* Transkription gewonnene HIV-TAR-RNA der gleichen Sequenz stand vom LS Biopolymere, Bayreuth zur Verfügung.

Für die Klonierung eines eukaryotischen GFP-Fusionsvektors wurde ein pcDNA3.1-CT-GFP/TOPO-cloning Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande) verwendet.

Für den Einsatz als DNA -Standard wurde pUC19/*Msp*I, λ -DANN und dNTP's (je 10 mM) von MBI Fermentas (Vilna, Litauen) bezogen.

3.7 Biochemikalien und Chemikalien

Amersham Biosciences (Freiburg): Chelating Sepharose Fast Flow, Biochrom (Berlin): DMEM, Trypsin/EDTA-Lösung, Gentamycin, fetales Kälberserum, Biozym (Hess. Oldendorf): Agarose, NueSieve GTG-Agarose, SeaKem GTG Agarose, Fluka (Neu-Ulm): Coomassie Brilliant Blau, Bromphenolblau, Triton X-100, Gerbu (Gaiberg): IPTG, Ampicillin, Kanamycinsulfat, NBT, BCIP, Tween20, Molecular Probes (Leiden, Niederlande): ToPro-3, PE Applied Biosystems (Warrington, UK): Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Promega (Madison, USA): TransFast Transfektionsreagenz, rRNasin, Dualer Luciferase Assay, Roche (Mannheim) Complete-Protease-Inhibitor-Tabletten, Roth (Karlsruhe): Agar, Ethidiumbromid, Dithiothreitol, Rotiphorese Gel 40, Roti-Load 4x konz., N-,N-,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Sigma (Deisenhofen): Glutathion (red.), Tetracyclin, Chloramphenicol, Gesamt tRNA aus Hefe, Triethylamin

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. oder vergleichbarer Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), und Sigma (München) bezogen.¹

3.8 Sonstige Materialien

Amersham Biosciences (Freiburg): GST MicroSpin Purification Module NAP-25, Millipore (Bedford, USA): Filter VSPW02500, Roth (Karlsruhe): Rotilab-Mikrotiter-Platten,

Spectra/Por-Dialyseschlauch (MWCO:3500), Sartorius (Göttingen): Minisart Sterilfilter (0,22 µm), Nunc (Wiesbaden): Mikrotiterplatten Polysorp 96F, Roche (Mannheim): Streptavidin beschichtete Röhrchen, BioRad (München): Micro-Bio-Spin 30, Whatman (Maidstone, England): Blotting Papier 3MM CHR, Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA): Culture Slides

3.9 Software

Zur Erstellung von Restriktionskarten, für die Datenbanksuche sowie mRNA Sekundärstrukturvorhersagen wurden Programme des Wisconsin Packages verwendet (Genetic Computer Group Inv., Version 9.0 (1996), Wisconsin, USA)

Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit ABI Prism Sequencing Analysis 3.4.1.

4 Methoden

4.1 Kultivierung von Bakterien

Zur Anzucht von *E. coli* Stämmen wurden je nach Bedarf 5 ml bis 2 l LB-Medium inokuliert und bei 37 °C über Nacht bei 200 rpm (Schüttler Infors HT, Infors AG, Bottmingen, CH) geschüttelt. Wurden mehr als 50 ml Medium benötigt, erfolgte die Inokulation durch eine im gleichen Medium gewachsene Vorkultur, wobei ein Hundertstel des Endvolumens zugegeben wurde. Bei der Anzucht von Bakterien mit Plasmiden wurden dem Medium zusätzlich Antibiotika (Tabelle 3-2) mit den in Kap. 3.4.1 vorgegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

Expressionsversuche von *E. coli* BL21(DE3)-Stämmen mit pHIS-hCycT1(272Δ) erfolgten in 100 ml TB-Medium mit Ampicillin. Es wurde jeweils mit einer Übernachtskultur (ÜNK) auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,1 angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Sobald eine OD_{600} zwischen 0,6 und 0,8 erreicht war, wurde der *lacUV5*-Promotor durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Zur Analyse der erfolgten Expression wurde vor und jeweils eine, zwei, drei sowie vier Stunden nach Induktion ein Aliquot (1 OD/ml) der Kultur entnommen.

Für eine Überproduktion in größerem Maßstab (zur Gewinnung von etwa 20 mg Protein) wurden vier 1000 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 500 ml TB-Medium und Ampicillin wie oben beschrieben mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) pHIS-hCycT1(272Δ) beimpft und induziert. Nach weiteren 4 Stunden wurde das Zellmaterial in einer Kühlzentrifuge (10 min, 5000 rpm, 4 °C) geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Die Überexpression von *E. coli* BL21-Stämmen mit unterschiedlichen pGEX-tat-Varianten wurde in 20 ml LB-Medium mit Ampicillin analog der Anzucht von HIS-hCycT1(272Δ) durchgeführt.

Die Stammhaltung der *E. coli* Stämme erfolgte entweder auf Agarplatten oder als Glycerinkultur. Hierfür wurden Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase entweder auf Agarplatten ausgestrichen, bei 4 °C gelagert und etwa alle 8 Wochen neu überimpft oder in LB-Medium mit 15 % Glycerin (v/v) bei -80 °C aufbewahrt. Trugen die Stämme Plasmide, enthielten die Platten und LB-Medien das jeweilige Antibiotikum.

4.2 Bestimmung des Bakterientiters

Zur Bestimmung des Bakterientiters wurde in Mikrotiterplatten 100 µl LB-Medium vorgelegt und durch Übertragen von jeweils 10 µl (beginnend mit 100 µl unverdünnter Bakteriensuspension) eine Verdünnungsreihe bis 10^{-9} angelegt. Von den Verdünnungen wurden jeweils 20 µl auf eine LB-Platte mit den jeweiligen Antibiotika aufgetropft, 10 min

bei RT getrocknet und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Tropfen („spots“) mit einzelnen Kolonien ausgezählt und der Bakterientiter durch Multiplikation der erhaltenen Koloniezahl mit dem 50-fachen Verdünnungsfaktor ermittelt werden.

4.3 Produktion von Phagen

4.3.1 M13-Phagen

Zur Amplifizierung von M13-Phagen wurde mit einer Pasteurpipette ein einzelner Phagenplaque von einer Platte mit einem Rasen von *E. coli* ER2738, die mit dem Phagen infiziert waren, gepickt und damit eine 20 ml Kultur von *E. coli* ER2738 mit einer OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und 4,5 Stunden bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Alle Medien enthielten 20 µg/ml Tetracyclin. Der Phagenüberstand wurde durch zweimaliges Zentrifugieren der Bakterienkultur in einer Kühlzentrifuge bei 5000 rpm und 4 °C gewonnen.

4.3.2 VCSM-Helferphagen

Zur Produktion von VCSM-Helferphagen wurde mit einer Pasteurpipette ein einzelner Phagenplaque von einer Platte mit einem Rasen von *E. coli* XL1 Blue-Zellen, die mit dem jeweiligen Phagen infiziert waren, gepickt. Die Platten sowie alle nachfolgenden Medien für die Präparation von VCSM-Helferphagen enthielten zusätzlich 50 µg/ml Kanamycin. Mit dem Plaque wurden 20 ml 2xLB-Medium inokuliert und über Tag bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Je 10 ml dieser Vorkultur wurden zu 500 ml 2xLB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Phagenüberstand durch zweimaliges Zentrifugieren der Bakterienkultur in einer Kühlzentrifuge bei 8000 rpm und 4 °C gewonnen.

Die Anzucht von Bakterien mit Phagemiden erfolgte analog zu der Plasmide tragender Zellen (Kap.4.1).

Für die Gewinnung von Phagemid-Partikeln musste die Anzucht mittels Helferphagen erfolgen, da das Phagemid nicht für alle nötigen Strukturproteine kodiert.

4.3.3 Verpacken von pAK-Phagemiden

Für die Gewinnung von pAK-Partikeln wurden 12 ml 2xYT (konz.)-Medium mit 3 ml 5xPhosphatpuffer (pH 7,0), 300 µl Glukose (50 %), 15 µl Tetracyclin und Chloramphenicol in einem 200 ml Erlenmeyerkolben mit einer ÜNK von pAK tragenden *E. coli* XL1 Blue Zellen zu einer OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C und unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert und anschließend mit 30 µl eines VCSM-Helferstammlösung (10^{11} pfu/ml) versetzt. Nach Infektion der Zellen (15 min, ohne Schütteln)

wurde zu den Kulturen 24 ml 2xYT (konz.)-Medium, 6 ml 5xPhosphatpuffer (pH 7,0) sowie 30 µl Tet und Cm gegeben. Zur Expression der Gp3ss-Fusionsproteine wurde zusätzlich IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 26 bis 30 °C unter Schütteln inkubiert, wobei 2 h nach Induktion 50 mg/ml Kanamycin zugesetzt wurde. Am nächsten Tag wurde der Überstand mit Phagemid-Partikeln und Helferphagen durch zweimaliges Zentrifugieren der Bakterienkultur (20 min, 5000 rpm, 4 °C) erhalten.

4.3.4 PEG-Fällung von Phagen

Die Konzentration von Phagenüberständen erfolgte durch Zugabe von 0,2 Vol. PEG-Lösung zu den jeweiligen Überständen. Phagenüberstände mit einem Volumen größer 50 ml wurden anschließend für mindestens 2 h unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Die Phagen wurden durch 40-minütiges Zentrifugieren bei 4 °C mit 5000 rpm präzipitiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde einmal in 1 -10 ml Bindungspuffer (pH 6,9) gelöst und erneut 20 min bei 4 °C und 9000 rpm zentrifugiert. Das Phagenpräzipitat wurde anschließend mit Bindungspuffer (pH 6,9) in einem Hundertstel des ursprünglichen Kulturvolumens resuspendiert, mit 1 mM PMSF (Endkonzentration) versetzt und bei 4 °C gelagert.

Kleine Mengen an Phagenüberständen (bis zu 1,6 ml) wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen mit 0,2 Vol. PEG-Lösung versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 4 °C, 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das erhaltene Pellet in 100 µl Bindungspuffer (pH 7,5) gelöst. Danach wurde erneut 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit Bindungspuffer (pH 7,5) in einem Fünfzigstel des ursprünglichen Kulturvolumens resuspendiert.

4.3.5 Bestimmung des Phagentiters

Zur Titerung von Helferphagen und Phagemiden mit Antibiotikaresistenzen wurden die „colony forming units“ (*cfu's*) bestimmt.

Hierfür wurde in Mikrotiterplatten 100 µl TBS vorgelegt und durch Übertragen von jeweils 10 µl (beginnend mit einem unverdünnten Phagenüberstand bzw. einer 1:10 Verdünnung PEG-präzipitierter Phagen) eine Verdünnungsreihe bis 10^{-13} angelegt. Anschließend wurden 100 µl *E. coli* XL1 Blue-Zellen zu den Verdünnungen pipettiert und 15 min bei 37 °C inkubiert.

Zur Ermittlung der *cfu's* wurden direkt 20 µl der Verdünnungen auf LB-Platten mit Antibiotika (VCSM: Kan 50 µg/ml, pAK: Cm 34 µg/ml) getropft, 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch Auszählen der

Tropfen mit Einzelkolonien konnte der Titer durch Multiplikation mit dem 50-fachen Verdünnungsfaktor bestimmt werden.

4.4 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Zur Vermehrung eukaryotischer Zellen wurde das Medium (DMEM mit Zusätzen (Kap.3.4.1)) von einem Zellmonolayer abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 10 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Nach kurzem Schwenken wurden 2 ml der abgelösten Zellen in frische 75 cm²-Kulturflaschen (TPP, Trasadingen, Schweiz) in denen 25 ml frisches Medium vorgelegt waren pipettiert. Die Zellen wurden bei 37°C und 7,5 % (v/v) CO₂-Atmosphäre (CB150, WTB Binder, Tuttlingen) über drei bis vier Tage bebrütet.

4.5 Absorptionsmessung

Absorptionsmessungen im UV-VIS-Bereich wurden mit einem Uvikon 930 Zweistrahl-Spektralphotometer (UV Mini 1240, Shimadzu, Kyoto, Japan) bestimmt. UV-Absorptionsspektren von Proteinen wurden in Quarzküvetten der Schichtdicke 1 cm (Hellma, Müllheim) durchgeführt. Für Messungen im sichtbaren Bereich wurden Polystyrol-Halbmikroküvetten der Schichtdicke 1 cm (Roth, Karlsruhe) verwendet. Der gewählte Messbereich lag zwischen 0,1 und 0,8 Absorptionseinheiten. Lösungen mit höheren Werten wurden entsprechend mit dem jeweiligen Referenz-Medium bzw. Puffer vorverdünnt.

4.5.1 Bestimmung der Bakteriendichte

Trübungsmessungen von Bakterienkulturen erfolgten bei 600 nm, wobei 1 Absorptionseinheit (OD₆₀₀) einer Bakteriendichte von etwa 1×10^9 Zellen/ml entspricht.

4.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen wurde die Absorption der jeweiligen Lösungen bei 260 nm (A_{260}) ermittelt. Dabei gilt im allgemeinen, dass 1 A_{260} einer dsDNA-Menge von 50 µg, einer ssDNA-Menge von 33 µg sowie einer RNA-Menge von 42 µg entspricht (Sambrook et al. 1989). Bei Nukleinsäurelösungen mit einem guten Reinheitsgrad liegt der Quotient von A_{260}/A_{280} zwischen 1,7 und 2,0.

Da Absorptionsmessungen keine Rückschlüsse auf die Art der Nukleinsäurespezies zulassen (z.B. Verunreinigung einer Plasmidpräparation mit genomischer DNA oder RNA) wurden DNA-Proben zusätzlich optisch im Agarosegel (Kap. 4.8.1) überprüft. Hier konnte ebenfalls

die Konzentration grob, durch Vergleich der Intensitäten der Ethidiumbromid-gefärbten Proben mit einem Molekulargewichtsstandard bekannter Konzentration, ermittelt werden.

Für die exakte Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäuren, die Sekundärstrukturen ausbilden, wurde der molare native Extinktionskoeffizient des jeweiligen Moleküls bei 260 nm (ϵ_{260nat}) verwendet. Die Ermittlung von ϵ_{260nat} erfolgte nach Gleichung 4-1 durch den Vergleich der Absorptionen der nativen RNA und der RNA nach Totalhydrolyse. Hierfür wurde zuerst die A_{260nat} der RNA-Lösung bestimmt. Anschließend wurden zu der Probe 5 μ l 10 M NaOH pipettiert, 30 min bei 90 °C inkubiert und die $A_{260denat}$ der entstandenen Nucleotidlösung bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{260denat}$) der Nucleotidlösung ließ sich durch Addition tabellierter Werte (Puglisi und Tinoco, 1989) für die einzelnen Nucleosid-5'-monophosphate und der Sequenz der Nucleinsäuremoleküls berechnen. Somit ergab sich ϵ_{260nat} aus folgender Gleichung.

$$\epsilon_{nat260} = \frac{A_{260nat} \cdot \epsilon_{260denat}}{A_{260denat}} \quad (\text{Gleichung 4-1})$$

War ϵ_{260nat} für ein bestimmtes Nucleinsäuremolekül bekannt, konnte die Konzentration der nativen Nucleinsäurelösung durch Messung der A_{260} mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt werden.

$$c = \frac{A}{\epsilon_{nat} \cdot d} \quad (\text{Gleichung 4-2})$$

mit: c, Konzentration [M]; A, Absorption; d, Schichtdicke der Küvette [cm] und ϵ_{nat} , molarer Extinktionskoeffizient des nativen Moleküls [$M^{-1}cm^{-1}$]

4.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der molare native Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280nat}) des jeweiligen nativen Proteins herangezogen. Der molare native Extinktionskoeffizient wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten des entfalteten Proteins bei 280 nm ($\epsilon_{280GdnHCl}$) und dem Verhältnis der Absorption des nativen und entfalteten Protein bei 280 nm (A_{280nat} bzw. $A_{280GdnHCl}$) nach folgender Formel bestimmt (Gill & von Hippel, 1989).

$$\epsilon_{nat280} = \frac{A_{280nat} \cdot \epsilon_{280GdnHCl}}{A_{280GdnHCl}} \quad (\text{Gleichung 4-3})$$

$\epsilon_{280GdnHCl}$ ergibt sich durch Addition tabellierter Werte (Gill und Hippel, 1989) für jeden Tryptophanrest ($5690 M^{-1}cm^{-1}$), Tyrosinrest ($1280 M^{-1}cm^{-1}$) und vorhandenen Cysteinrest ($120 M^{-1}cm^{-1}$) in der Aminosäuresequenz des Proteins.

Mit der Annahme, dass $\epsilon_{280\text{GdnHCl}} \cong \epsilon_{280\text{nat}}$ (Gill and von Hippel, 1989) konnte nun die Konzentration von Proteinen durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt werden. Hierfür galt ebenfalls das Lambert Beer'sche Gesetz (Gleichung 4-2).

4.6 Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren erfolgte an einem LS50B (Perkin-Elmer) Spektropolarimeter in Standard-Fluoreszenzküvetten aus SUPRASIL Quarzglas (d=1 cm, Hellma, Müllheim) in einem Volumen von 2 ml. Die Messung Fluorescein-gelabelter Peptide erfolgte unter Rühren in 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, 50 mM NaCl bei einer Excitationswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Für einen Messpunkt wurden 589 Datenpunkte in einer Minute aufgenommen und gemittelt. Für jeden Messpunkt wurde eine Nullpunktkorrektur durchgeführt. Die Konzentration der Peptide wurde durch eine Messung bei 495 nm (dem Absorptionsmaximum von Fluorescein) bestimmt.

4.6.1 Bestimmung von Dissoziationskonstanten (K_D) mit Fluoreszenzmessungen

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) aus Fluoreszenzdaten wurde durch nichtlineares Fitten der Kurven mit dem Programm SigmaPlot (Vers. 6.0) durchgeführt. Die Berechnung des K_D erfolgte mit folgender Gleichung:

$$F = F_{\min} + \frac{\left(1 + \frac{c_{\text{ges}} + E_{\text{ges}}}{K_D} - \sqrt{\left(1 + \frac{c_{\text{ges}} + E_{\text{ges}}}{K_D}\right)^2 - 4 \frac{c_{\text{ges}} \cdot E_{\text{ges}}}{K_D^2}}\right) K_D (F_{\max} - F_{\min})}{2 \cdot E_{\text{ges}}}$$

(Gleichung 4-4)

Variablen:

E_{ges} : Konzentration des vorgelegten Fluorophors

c_{ges} : Konzentration der titrierten Komponente

F_{\min} : minimal beobachtete Fluoreszenz

F_{\max} : maximal beobachtete Fluoreszenz

K_D : abgeschätzte Dissoziationskonstante

4.7 Zentrifugation

Zentrifugationen wurden in Abhängigkeit von Volumina, Geschwindigkeit und Temperatur in folgenden Zentrifugentypen durchgeführt:

Tischzentrifuge Sigma 2K15 (Sigma, Osterode) für Probenvolumina bis 2,0 ml unter Kühlung bis max. 13000 rpm.

Tischzentrifuge Biofuge 13 (Hereus, Hanau) für Probenvolumina bis 1,5 ml bei RT bis max. 13000 rpm.

Kühlzentrifuge Sorvall RC50 Plus (Hereus, Hanau) für Probenvolumina bis 30 ml mit einem SS34 Rotor bis max. 18000 rpm, für Probenvolumina bis 500 ml mit einem GSA Rotor bis max. 9000 rpm unter Kühlung und für Deep-well-Platten (96 x 2,0 ml) und Mikrotiterplatten (96 x 0,3 ml) mit einem SH-3000 Rotor bis max. 4300 rpm.

Tischzentrifuge Hettich 35R (Hettich, Tuttlingen) mit einem Ausschwingrotor Typ 1424A für Probenvolumina bis 50 ml und max. 5000 rpm.

4.8 Elektrophoretische Verfahren

4.8.1 Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophoresen wurden zur Kontrolle von Plasmidpräparationen und Restriktionsreaktion sowie zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Je nach Probenvolumen und Anzahl wurden Gele der Größe 5 cm x 7,5 cm, 7,5 cm x 10 cm oder 20 cm x 20 cm (GNA-100, bzw. GNA-200, Amersham Biosciences, Freiburg) gegossen. Agarose wurde in Konzentrationen von 0,8 bis 3 % (w/v) durch Aufkochen in 1xTAE-Puffer gelöst, mit 5 µl einer 1 %igen Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Agaroselösung versetzt. Für analytische Gele wurde Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf), für präparative Gele wurden 'low melting Agarosen' der Firmen Biozym (Hess. Oldendorf) verwendet. Die Proben wurden jeweils mit 1/5 Volumen Auftragspuffer (50 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylencyanol) vermischt und in die Geltaschen pipettiert.

Als Längenstandard wurde *Hind*III restrigierte (Kap. 4.12.1) DNA des Bakteriophagen λ (Fragmentgrößen: 23,13; 9,416; 6,557; 4,361; 2,322; 2,027; 0,564; 0,125 kb) oder *Msp*I verdaute *pUC*19-DNA (Fragmentgrößen: 0,501; 0,489; 0,404; 0,331; 0,242; 0,190; 0,147; 0,111; 0,110; 0,067; 0,034; 0,034; 0,026 kb) eingesetzt.

Die Elektrophorese wurde bei konstant 90 V (5 cm x 7,5 cm), 100 V (7,5 cm x 10 cm) bzw. 130 V (20 cm x 20 cm) durchgeführt. Die DNA-Banden wurden anschließend durch Fluoreszenz auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem Geldokumentationssystem (BioDocII, Biometra, Göttingen) festgehalten.

4.8.2 Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophoresen (Harnstoff-PAGE) wurden zur Überprüfung käuflich erworbener RNA's oder DNA-Oligonukleotiden eingesetzt.

Analytische Harnstoff-Polyacrylamidgele wurden zwischen Gelplatten der Größe 16 cm x 18 cm und einer Dicke von 0,75 mm gegossen. Es wurden 15 % Acrylamidgele, die 0,6 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid und 8,3 M Harnstoff in 1xTBE-Puffer enthielten, verwendet. Für die Herstellung der Gele wurden Fertiglösungen der Firma Roth (rothiphorese Sequenziergel-Lösungen) eingesetzt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 8 µl N-,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 160 µl APS gestartet. Die Proben wurden in 1xTBE-Puffer mit 8,3 M Harnstoff aufgenommen und die Elektrophorese in 1xTBE-Puffer in einer Hoefer SE400-Kammer (Amersham Biosciences) bei konstant 800 V für ca. 2 h durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Ethidiumbromid (Kap.4.9.3) gefärbt.

4.8.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die native PAGE wurde für Protein-RNA-Bindungsexperimente (Gelretardation) mit radioaktiv markierter RNA eingesetzt. Es wurden 4 % Gele der Größe 16 cm x 16 cm in einer Dicke von 1 mm mit einer Lösung aus 4 % Acrylamid, 0,1875 % Bisacrylamid, 5 % Glycerin in TG gegossen. Nach Sterilfiltration der Lösung erfolgte die Polymerisation nach Zugabe von 20 µl TEMED und 200 µl APS. Nach einer Stunde wurde ein Vorlauf von 30 min bei 150 V gestartet. Um das Einsinken der Proben in die Taschen zu gewährleisten waren alle Proben mit 12 % (v/v) Glycerin versetzt. Die Elektrophorese wurde für 75 min bei 200 V durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel auf Whatman 3 MM Papier gelegt und mit Plastikfolie abgedeckt. Anschließend wurde für 16 Stunden eine BAS-III's-Platte (Fuji, Edison, NJ, USA) aufgelegt und diese im Phospho-Imager (Fujix BAS1000, Fuji, USA) detektiert.

4.8.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Denaturierende Elektrophoresen mit Natriumlaurylsulfat (SDS-PAGE) wurden zur analytischen Trennung von Proteingemischen verwendet. War ein Trennbereich zwischen 10 kDa und 100 kDa nötig, wurden 15 %ige Gele im diskontinuierlichen System (Laemmli, 1970) gefahren. Es wurden Gele der Größe 10 cm x 10,5 cm und einer Dicke von 0,75 mm gegossen und in einer Mighty Small II SE260 Gelelektrophorese-Kammer (Hoefer/Amersham Biosciences, Freiburg) gefahren.

Das Trenngel bestand aus 17,5 % bzw. 20 % (w/v) Acrylamid, 2,7 % (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 375 mM Tris/HCl, pH 8,8. Das Sammelgel bestand aus 8 % (w/v) Acrylamid, 0,21 % (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % SDS und 125 mM Tris/HCl, pH 6,8. Die Polymerisation wurde durch 8 µl TEMED und 40 µl einer 10 % (w/v) APS-Lösung pro 20 ml Gel gestartet.

Jeweils 10 µl der zu trennenden Proteinprobe (bis max. 20 µg Protein) wurden mit 2,5 µl Probenpuffer (Roti-Load 4x konz.) versetzt. Sollte die Proteinzusammensetzung von Bakterienzellen untersucht werden, bestand die Probe aus dem Zellpellet von 0,2 OD₆₀₀ einer Bakteriensuspension. Die Proben wurden vor dem Auftrag für mindestens 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem Laufpuffer mit 50 mM Tris, pH 8,3, 385 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS bei konstant 20 mA für etwa 1 h.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde jeweils 5 µl Standard (Kap.3.5) verwendet.

Die Gele wurden unmittelbar nach der Elektrophorese je nach Proteingehalt einer Coomassie-Blau-Färbung (Kap.4.9.1) oder einer Silberfärbung (Kap.4.9.2) unterzogen.

4.9 Färben von Proteinen und DNA

4.9.1 Coomassie-Blau-Färbung

Die Färbung mit Coomassie-Blau wurde für das Sichtbarmachen von Proteinmengen größer 1 µg verwendet. Hierfür wurden die Gele unmittelbar nach der Elektrophorese 30 min in Färbelösung (0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 % (v/v) Methanol, 9,2 % Essigsäure), anschließend 30 min in Entfärbelösung I (25 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Essigsäure) und bis zum völligen Entfärben des Gelhintergrundes in Entfärbelösung II (5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure) bei 30 rpm geschüttelt.

4.9.2 Silberfärbung

Zum Nachweis geringer Protein- und Peptidmengen (10 ng) wurde eine schnelle Silberfärbung ohne Glutaraldehyd-Fixierungsschritt durchgeführt (Bloom et al., 1987). Das Gel wurde für 10 min in Formaldehyd-Fixierlösung (40 % (v/v) Methanol, 0,0185 % (v/v) Formaldehyd) eingelegt, zweimal 5 min mit H₂O gewaschen und für 1 min in 0,02 % Natriumthiosulfatlösung geschwenkt. Nach zweimaligen Waschen für 20 s in H₂O wurde das Gel 10 min in einer 0,1 % Silbernitratlösung gefärbt. Nach kurzem Waschen mit H₂O wurde durch Zugabe von formaldehydhaltiger Entwicklerlösung (3 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat, 0,0185 % (v/v) Formaldehyd) der Entwicklungsprozeß gestartet. Nach Sichtbarwerden der Proteinbanden (1-15 min) wurde die Reaktion durch Zugabe eines gleichen Volumens 3 M Zitronensäure gestoppt. Nach 10 min Inkubation wurde

das Gel für weitere 10 min in H₂O gewaschen und dann in Trockenlösung (10 % (v/v) Ethanol, 4 % (v/v) Glycerin) gelagert.

4.9.3 Ethidiumbromid-Färbung

Analytische Harnstoff-Polyacrylamidgele wurden 15 min in einer 0,0001 %igen (w/v) Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Anschließend wurde die Gelmatrix über 30 min in H₂O entfärbt.

4.10 Fällung und Reinigung von Nukleinsäuren

4.10.1 Ethanolpräzipitation

Zur Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen wurden diese mit 2,5 Volumen vorgekühltem 2 M Ammoniumacetat in 99 % Ethanol vermischt. Gefällt wurde für mindestens 1 h. Die DNA wurde dann durch Zentrifugation (13000 rpm, 20 min, 4 °C, bzw. bei Microtiterplatten 4300 rpm, 1 h, 4 °C) präzipitiert. Zur Entfernung von überschüssigem Salz wurde das DNA-Pellet zweimal mit kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und über 20 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in einem geeignetem Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

4.10.2 Reinigung über Silikagel

DNA-modifizierende Enzyme sowie Salze konnten einfach durch den Einsatz von Silikagel (QIAEX II, Qiagen, Hilden oder Nucleotrap Extraktion Kit, Macherey-Nagel, Düren) aus der DNA-Lösung entfernt werden. Die Methode beruht auf der Bindung von DNA an Silikagel, die nur bei Anwesenheit einer hohen Konzentration chaotroper Salze stattfinden kann, da diese die Struktur von Wasser modifizieren (Hamaguchi, 1962). Dabei konnte gleichzeitig das Volumen auf minimal 30 µl eingeeengt werden. Die Reinigung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben (QIAEX II Handbuch, Qiagen, Hilden, bzw. Nucleotrap Handbuch, Macherey-Nagel, Düren). Eluiert wurde mit 30-50 µl 1 mM Tris/HCl, pH 8,0.

4.10.3 Mikrodialyse

Zum Entsalzen von DNA aus Ligationsansätzen wurden diese einer Mikrodialyse auf einem VSWP02500 Filter (Millipore, Bedford, USA) gegen H₂O für 20 min bei RT unterzogen.

4.11 Präparation von Plasmid-DNA

4.11.1 Präparation über Anionenaustauschchromatographie

Zur Präparation plasmidaler und Phagen-ssDNA für Sequenzierreaktionen (20 µg Maßstab) wurden erwerbliche Kits (QIAprep 96 M13, bzw. NucleoSpin Multi96 Plus) verwendet. Es wurde nach dem Protokoll der Hersteller vorgegangen und die DNA mit 100 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 eluiert. Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (100 µg Maßstab) wurden ebenfalls erwerbliche Kits (Plasmid Mini Kit, bzw. Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden oder Nucleobond AX20, bzw. Nucleobond AX100, Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte wie vom Hersteller empfohlen (Qiagen Plasmid Handbuch, Qiagen, Hilden, bzw. Nucleobond Handbuch, Macherey-Nagel, Düren). Die trockene DNA wurde in 40 µl (Mini-Kit) oder 150 µl (Midi-Kit) H₂O aufgenommen.

4.12 Enzymatische Modifikationen

4.12.1 Restriktion

Für den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurde die jeweilige DNA-Lösung (0,1 - 0,5 µg DNA/µl) mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer versetzt. Pro µg DNA wurden 1 bis 20 U Enzym eingesetzt. Für eine vollständige Restriktion wurden die Ansätze mindestens 1 h, teilweise auch über Nacht, beim Temperaturoptimum des Enzyms inkubiert. Sollte die DNA anschließend weiteren enzymatischen Schritten unterzogen werden, wurden Puffer und Enzym mittels QIAEX II (Kap. 4.10.2) entfernt. Die Vollständigkeit einer Restriktion wurde durch Agarosegelelektrophorese (Kap. 4.8.1) überprüft.

4.12.2 Phosphorylierung von 5'-Enden

Zur Phosphorylierung von Oligonukleotiden wurden 10 bis 100 pmol Oligonukleotid (Endkonzentration 10 µM) mit 100 µM ATP und 2 bis 10 U T4-Polynukleotidkinase (PNK, MBI, Vilna, Littauen) in 10 mM Tris/HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 mM β-Mercaptoethanol für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die PNK wurde durch 10 min Inkubation bei 70 °C inaktiviert und anschließend über eine MicroSpinColumn (Kap. 4.16.2) abgetrennt. Die phosphorylierten Proben wurden bei -20 °C gelagert.

4.12.3 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Dephosphorylierungsreaktionen wurden mit 1U alkalische Phosphatase (calf intestine phosphatase, CIAP, MBI, Vilna, Littauen) pro µg DNA in Dephosphorylierungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,3, 1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) durchgeführt. Zur

Entfernung von 5'-überhängenden Phosphatgruppen wurde nach 30 min Inkubation bei 37°C eine weitere Einheit CIAP zupipettiert und nochmals 30 min bei 37 °C inkubiert. Bei der Behandlung von stumpfen oder 3'-überhängenden Enden wurde der Ansatz jeweils 15 min bei 37 °C und 15 min bei 56 °C inkubiert. Enzym und Puffer wurden durch Verwendung von MicroSpinColumns (Kap. 4.16.2) entfernt.

4.12.4 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden 50 –100 ng Vektor-DNA eingesetzt und ein Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3 bis 1:10 gewählt und für jede Anwendung optimiert. Für die Klonierung von Bibliotheken wurden entsprechend höhere Vektormengen eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16 °C mit 1 U T4-Ligase je 200 ng Vektor-DNA in 50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8000 über Nacht. Nach Hitzeinaktivierung der Ligase (10 min, 65 °C) wurde der Ansatz durch Mikrodialyse (Kap.4.10.3) entsalzt und konnte dann in Bakterienzellen übertragen werden.

4.13 Annealing von Oligonukleotiden

Äquimolare Mengen (100 bis 250 pmol) der zu annealenden DNA-Stränge wurden 5 min in 50 µl 100 mM NaCl bei 95 °C temperiert und anschließend über 2-3 h langsam auf RT abgekühlt.

4.14 Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt eine selektive, enzymatische Anreicherung von DNA-Fragmenten *in vitro* (Saiki et al., 1985).

4.14.1 PCR mit Linker-Primern

Für die Klonierung einer Bibliothek wurde ein randomisiertes ssDNA-Ausgangsfragment mittels einer PCR vervielfältigt. Durch den Einsatz von Linker-Primern wurden passende Schnittstellen für eine Klonierung in das Zielplasmid generiert. Ein Anhängen von zusätzlich 8 bis 10 Nukleotiden vor die Erkennungsstelle gewährleistete, dass dem Enzym genügend Raum für die Anheftung an die DNA zur Verfügung stand.

In einem 50 µl Ansatz wurden 50-100 ng Plasmid-DNA, 5'-Primer bzw. 3'-Primer (äquimolar zwischen 0,1 und 1 µM) und 20-200 µM jedes dNTP's in 10 mM KCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Triton X-100, 1-5 mM MgSO₄ gemischt. Die Zugabe von 3 U Vent-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) erfolgte nach 5 min Denaturierung des DNA-Templates bei 95 °C. Standardmäßig wurden jeweils 25 Zyklen aus

30 s Denaturierung bei 95 °C, Primer-Annealing und Primer-Verlängerung gefahren (iCycler, BioRad, München, Deutschland). Die Primer wurden 15-30 s bei einer Temperatur, welche 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) des zuerst schmelzenden Primers lag, annealt. Die Verlängerung der Primer (Extension) erfolgte bei 72 °C über einen Zeitraum von 6-10 s pro 100 bp.

Die Berechnung des T_m -Wertes erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 69,4 + 0,41 \cdot (\% \text{ GC - Gehalt}) - \frac{650}{\text{Oligonukleotidlänge}} \quad (\text{Gleichung 4-5})$$

Nach erfolgter Amplifikation wurde ein Zehntel des PCR-Ansatzes durch Agarosegelelektrophorese (Kap.4.8.1) überprüft. Die Proben wurden entweder mittels „QIAEX II Purification Kit“ (Kap.4.10.2) von Enzym und Puffer oder durch Präparation des PCR-Amplifikates aus einem Agarosegel (Kap.4.8.1) zusätzlich vom Ausgangsplasmid, befreit. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde 1/10 des gereinigten Fragmentes auf einem Agarosegel analysiert (Kap.4.8.1).

4.14.2 Kolonie-PCR

Bakterienkolonien konnten auf erfolgreiche Klonierung ohne Präparation der plasmidalen DNA überprüft werden. Als Primer dienten Oligonukleotide, die stromaufwärts bzw. stromabwärts des klonierten Fragmentes hybridisierten.

In einem dünnwandigen PCR-Reaktionsgefäß wurden je 0,4 µM der beiden Primer, 200 µM jedes dNTP's, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50mM NaCl, 0,08 % Nonidet P-40 und 0,4 mg BSA/ml vorgelegt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde vorsichtig eine gut separierte Bakterienkolonie in den PCR-Ansatz überführt. Nach 5 min Denaturierung bei 95 °C wurden 3 U Taq-DNA-Polymerase (MBI-Fermentas, Vilna, Litauen) zupipettiert und 25 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Primer-Annealing bei 50 °C und 1 min Primer-Verlängerung bei 72 °C durchgeführt.

4.14.3 Ortsspezifische-Mutagenese durch 2-Schritt-PCR

Zum Austausch einer einzelnen Base wurde diese Mutagenesemethode (Landt et al., 1990) eingesetzt. In einer ersten PCR wurden die Komponenten wie in Kap. 4.14 beschrieben gemischt und amplifiziert. Dabei enthielt der 5'-Primer die gewünschte Nukleotidveränderung. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Kap.4.8.1) von der Plasmid-DNA getrennt, aus dem Gel präpariert (Kap.4.16.1) und in 40 µl

H₂O aufgenommen. Die zweite PCR wurde in einem 100 µl Maßstab durchgeführt, wobei das erste PCR-Produkt als „Doppelstrang-Primer“ eingesetzt wurde. Der Gegenstrangprimer wurde halb so konzentriert eingesetzt wie die Primer in der ersten PCR. Die Reaktionsprodukte wurden erneut mittels Agarosegelelektrophorese (Kap.4.8.1) getrennt, das Fragment der richtigen Größe aus dem Gel präpariert (Kap.4.16.1) und in 40 µl H₂O aufgenommen. Zur Bestimmung der Ausbeute wurden 4 µl des gereinigten Fragment gelelektrophoretisch analysiert (Kap.4.8.1).

4.15 Kassettenmutagenese

Sollten mehrere Aminosäuren gleichzeitig ausgetauscht werden, wurde eine Kassettenmutagenese durchgeführt. Als Kasette dienten jeweils zwei zueinander komplementäre synthetische Oligonukleotide. Die Enden waren so konstruiert, dass nach Annealing der nötige Überhang für eine Ligation mit restrigiertem Vektor vorlag.

Für die Kassettenmutagenese wurde 1 µg des Vektors, der das zu mutierende Gen enthielt mit den jeweiligen Enzymen restrigiert (Kap.4.12.1), gereinigt (Kap.4.10.2) und in einem Agarosegel analysiert (Kap.4.8.1). Jeweils 100 pmol des (+)-Strang- und des (-)-Strang-Oligonukleotid wurden in einem Volumen von 50 µl annealt (Kap.4.13). Anschließend wurden 50 ng restrigierter Vektor und 50 pmol Oligonukleotidkassette in einem 20 µl Ansatz über Nacht ligiert (Kap.4.12.4).

4.16 Reinigung von DNA-Fragmenten

4.16.1 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Abtrennung unerwünschter DNA-Spezies nach PCR (Kap.4.14) oder Restriktion (Kap. 4.12.1) wurden die Ansätze einer präparativen Agarosegelelektrophorese (Kap.4.8.1) unterzogen. Das gewünschte DNA-Fragment wurde nach Ethidiumbromid-Färbung ausgeschnitten und die DNA auf unterschiedliche Weise wiedergewonnen.

Standardmäßig wurde die DNA mit Hilfe des „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers gereinigt und in 50 µl H₂O aufgenommen.

Sollte das DNA Fragment für die Klonierung einer Bibliothek eingesetzt werden, wurde eine „low melting point“ Agarose eingesetzt (NueSieve GTG, Biozym, Hess. Oldendorf). Anschließend wurde die DNA anhand des QIAEX II- Protokolls aus dem Gel gereinigt und in 50 µl 1 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen.

4.16.2 Reinigung über Polyacrylamidgel

Zum Umpuffern und Entsalzen von DNA wurde diese über MicroBioSpin 30 Säulen, die mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 (BioRad, München) equilibriert waren, nach Angaben des Herstellers gereinigt. Hierbei wurden gleichzeitig Enzyme und Oligonukleotide kleiner als 12 Basenpaare entfernt.

4.17 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung von DNA wurde 1 µg DNA präpariert (Kap.4.11.1). Für die Sequenzierreaktion wurden 400 ng DNA in 6 µl H₂O mit 4 µl Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Warrington, UK) und 1 µl Sequenzierprimer (5 pmol/µl) gemischt und einer PCR unter folgenden Bedingungen unterzogen: Nach 5 sec Denaturierung bei 95 °C begannen 30 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 95 °C, 10 sec Primer-Annealing bei 55 °C und 4 min Primer-Verlängerung bei 60 °C durchgeführt.

Anschließend wurden die Kettenabbruchprodukte mit Ethanol präzipitiert (Kap.4.10.1) und nach Trocknung in 3 µl Ladepuffer (20 mM EDTA, pH 8,0, 6mg/ml BlueDextran in Formamid) aufgenommen. 2 µl der Probe wurden einer denaturierenden Harnstoff-PAGE in einem ABI Prism 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, Warrington, UK) unterzogen. Dabei kamen 4%ige Gele zum Einsatz.

4.18 Übertragung von DNA

Zum Übertragen von Plasmid-DNA in Bakterienzellen wurde sowohl die CaCl₂-Methode (Cohen et al., 1972) als auch Elektroporation (Dower et al., 1988) verwendet.

In Fällen, in denen nur geringe Transformationseffizienzen nötig waren (Übertragen eines Plasmids auf einen Bakterienstamm), wurde die CaCl₂-Methode eingesetzt. Waren hohe Transformationseffizienzen nötig, wie z.B. bei der Klonierung von Bibliotheken wurden die Bakterien einer Elektrotransformation (Elektroporation) unterzogen.

4.18.1 Transformation von Bakterien mit der CaCl₂-Methode

Die chemische Transformation von Bakterien erfolgte nach Hanahan, 1983.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit einer ÜNK auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 bei 37 °C inkubiert, die Zellen anschließend durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min bei 4 °C pelletiert, in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml der Lösung aufgenommen und mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in

1 ml CaCl_2 -Lösung resuspendiert und in 50 μl Aliquote geteilt. Die Zellen konnten direkt für eine Transformation eingesetzt oder bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ bis zu einem Jahr gelagert werden.

Für die Transformation wurden zu 50 μl kompetenter Zellen 20-100 ng Plasmid-DNA pipettiert und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach 90 s bei $42\text{ }^\circ\text{C}$, gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis wurde 1 ml SOC-Medium zu den Zellen gegeben und der Ansatz für 1 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Anschließend wurden direkt 100 μl der transformierten Bakterien sowie eine 1:100 und eine 1:1000 Verdünnung des Ansatzes auf das jeweilige Selektivmedium ausplattiert. Die restliche Bakteriensuspension wurde durch Zentrifugation (1 min, 10000 rpm, $4\text{ }^\circ\text{C}$) konzentriert und auf eine weitere Platte mit Selektivmedium aufgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank (B6000, Hereus, Hanau) inkubiert.

4.18.2 Elektroporation von Bakterien

Für die Präparation elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde 1 l LB-Medium mit einer ÜNK auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,7 bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt (200 rpm). Die Zellen wurden in vorgekühlten Zentrifugenbechern pelletiert (15 min, 4000 rpm, $4\text{ }^\circ\text{C}$) und im weiteren Verlauf immer auf Eis gehalten. Das Medium wurde vollständig abgezogen und das Zellpellet vorsichtig in 1 l Glycerinlösung (10 % (v/v)) resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut wie oben abzentrifugiert und zuerst in 500 ml sowie anschließend in 250 ml Glycerinlösung aufgenommen und erneut pelletiert. Schließlich wurden die Bakterien in 3 ml Glycerinlösung resuspendiert (ca. $1\text{-}3 \times 10^{10}$ Zellen/ml) und in 40 μl Aliquote geteilt. Die Zellen konnten direkt für eine Elektroporation eingesetzt oder bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ bis zu einem Jahr gelagert werden.

Für die Elektroporation wurden 10-1000 ng Vektor-DNA bei maximal 3 μl Volumen in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (\varnothing 0,1 cm, Bio-Rad, München) pipettiert, 40-80 μl elektrokompente Zellen zugemischt und 2 min auf Eis inkubiert. Die Küvette wurde in einen ebenfalls vorgekühlten Schlitten eingesetzt und sofort in die Schockkammer des Elektroporators (*E. coli* Pulser, Bio-Rad, München) eingeführt. Der Puls erfolgte mit 1,8 kV. Die Bakterien wurden sofort vorsichtig mit 1 ml auf RT temperiertem SOC-Medium vermischt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ unter Schütteln (200 rpm) für 1 h inkubiert. Die elektrotransformierten Zellen wurden wie oben beschrieben auf Platten mit Selektivmedium transferiert und bebrütet.

4.18.3 Transfektion von Eukaryotenzellen

Eukaryotische Zellen wurden transient mit Plasmid-DNA mit Hilfe eines kationischen Lipides transfiziert (Felgner et al., 1987).

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in einer 6 well-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) in einer Dichte von 2×10^5 Zellen je well ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 50 % konfluent gewachsen waren. Für die Transfektion wurde das alte Medium von den Zellen abgezogen und 1 x mit PBS gewaschen. 0,5 – 10 µg der jeweiligen Plasmid-DNA wurde mit 1,5 – 30 µl TransFast Transfektionsreagenz (Kap. 3.7) gemischt und das Volumen mit serumfreien DMEM auf 840 µl aufgefüllt. Nach kurzem vortexen wurde das Gemisch 15 min bei RT inkubiert und anschließend langsam zu den gewaschenen Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C und 7,5 % CO₂ im Brutschrank wurden 3 ml DMEM mit Zusätzen zugegeben. Aktivitätstests wurden 48 h nach Transfektion durchgeführt.

4.19 Färbung von Eukaryotenzellen

Um den Zellkern von Eukaryotenzellen für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, wurde DNA mit dem Farbstoff ToPro-3 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) angefärbt. Von einem Zellmonolayer, der auf einem Objektträger gewachsen war, wurde das Medium abgezogen und dieser 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 20 min mit 3,7 %igem Formaldehyd in PBS fixiert und nachfolgend 2 x mit PBS gewaschen. Um die Permeabilität der Zellen für den Farbstoff zu gewährleisten, wurden die Zellen 5 min mit 1 %igem Triton in PBS behandelt und einmal mit PBS gewaschen. Für die Färbung wurde eine 5000fache Verdünnung von ToPro-3 in PBS hergestellt und mit dieser wurden die Zellen für 5 min gefärbt. Abschließend wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen, mit Fluorescent Mounting Media (DAKO, Glostrup, Dänemark) beschichtet und mit einem Deckglas versiegelt.

4.20 Isolierung von bakteriell überexprimiertem Protein

4.20.1 Herstellung von Zellrohextrakt und Zellaufschluß

Das Bakterienpellet von überproduzierenden, pGEX-tat-Variante tragenden *E. coli* BL21 wurde in 4 ml PBS, das Bakterienpellet pHis-hCycT1(272Δ) tragender *E. coli* BL21(DE3) in 4 ml Bindungspuffer (5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9, 2 mM DTT) pro g Zellfeuchtgewicht resuspendiert. Zusätzlich wurde je 50 ml Volumen eine Complete-Protease-Inhibitor-Tablette (Kap. 3.7) und DTT (Endkonzentration 2 mM) zugegeben. Die Zellen wurden viermal für je 5 min bei 4 °C mit 50 W sonifiziert (Braun, Labsonic, Biotech International). Anschließend wurden je 5 µg/ml DNase I und Lysozym sowie 0,1 % Triton X100 zugegeben und die Lösung 30 min unter Rührung auf einem Magnetrührer bei 4 °C inkubiert. Zum Abschluss wurden die unlöslichen Zellbestandteile und unaufgeschlossene Zellen durch Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4 °C abgetrennt.

4.20.2 Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose

Die Reinigung von HIV-Tat mit GST-Fusion erfolgte durch Chromatographie an Glutathion-Sepharose in einem GST-MicroSpin Purification Modul (Amersham Biosciences, Freiburg). Alle verwendeten Puffer wurden zuerst durch Filtration von Schwebeteilchen befreit (\varnothing 0,2 μm , Millipore, Bedford, USA). Die Glutathion-Sepharose-Säule wurde mit 600 μl PBS, 2 mM DTT gespült. Dann wurde das in PBS vorliegende Proteingemisch auf die Säule aufgetragen und die Säule wurde dreimal mit 600 μl PBS, 2 mM DTT gewaschen. Anschließend wurde das gebundene GST-Fusionsprotein mit GSH-Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM KCl, 30 mM reduziertes GSH, 5 mM DTT) von der Säule eluiert. Dazu wurde die Säule dreimal mit je 200 μl GSH-Elutionspuffer 10 min bei RT inkubiert und dann das Fusionsprotein eluiert. Das GST-Tat enthaltende Eluat wurde anschließend mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 50 %) und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.20.3 Affinitätschromatographie an Metal-Chelating-Sepharose

Die Reinigung von humanem CyclinT1 mit Histidinanhang erfolgte durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an Metal-Chelating-Sepharose Fast Flow (Kap.3.7). Die Proben wurden dabei mit einer Flussrate von ca. 3 ml/min auf die Säule gepumpt (Peristaltic Pump P1, Amersham Biosciences). Alle verwendeten Puffer wurden zuerst durch Filtration von Schwebeteilchen befreit (0,2 μm , Millipore, Bedford, USA).

Die Affinitätssäule wurde mit 3 Säulenvolumina deionisiertem H_2O , 4 Volumina Beladungslösung (50 mM NiSO_4) und 3 Volumina Bindungspuffer (5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9, 2 mM DTT) gewaschen. Nun konnte das in Bindungspuffer vorliegende Proteingemisch auf die Säule aufgetragen und mit 5 Volumina Bindungspuffer, sowie 5 Volumina Waschpuffer (60 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9), gespült werden. Anschließend wurde das Fusionsprotein mit einem steigenden Imidazol-Gradienten (200 mM bis 1 M in 100 mM Schritten) in Elutionspuffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9, 2 mM DTT) eluiert. Es wurden Fraktionen von 3 ml Volumen gesammelt. Das Histidin-Fusionsprotein enthaltende Eluat wurde über NAP-25-Säule entsalzt und anschließend lyophilisiert.

4.21 Dualer Luciferase-Assay

Die Aktivität von Firefly-Luciferase wurde mit einem Dualen Luciferase Assay bestimmt (Promega, Madison, USA). Das Prinzip der Methode beruht auf der Bestimmung der Aktivität von zwei Luciferasen, der Firefly-Luciferase unter Kontrolle eines zu testenden Promotors und der Renilla-Luciferase, die unter einem schwachen, konstitutivem Promotor steht und somit als interner Standard dient. Beide Luciferasen benötigen verschiedenen Substrate.

Zur Gewinnung von Zellextrakt wurde das alte Medium von einem Zellmonolayer abgezogen und dieser einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in einer 6 well Platte mit 500 μ l Passivem Reporter Lysis Puffer (Promega, Madison, USA) versetzt und 30 min bei RT wenig geschüttelt. Die Zellysate wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und entweder sofort auf ihre Luciferase Aktivität untersucht oder sie wurden bei -80 °C gelagert.

Für den Assay wurden in einer weißen Microtiterplatte (Polysorp96 F, Nunc, Wiesbaden) 20 μ l Zellysat vorgelegt. Die Messung der Luminiszenz erfolgte an einem Victor² (Wallac, Freiburg). Über die Injektoren des Victor² wurden 100 μ l Luciferase-Assay-Substrat zupipettiert und die Luminiszenz der Firefly-Luciferase über einen Zeitraum von 20 s gemessen. Anschließend wurde über einen zweiten Injektor 100 μ l Stop & Glo-Lösung zupipettiert und die Luminiszenz bestimmt. Die Stop & Glo-Lösung dient gleichzeitig der Unterdrückung der Luminiszenz der Firefly-Luciferase. Die Aktivität des zu testenden Promotors ergab sich dann als das Verhältnis der beiden Luciferasen zueinander.

4.22 Gelretardationsexperimente

Die Nukleinsäurebindungsspezifität von Proteinen wurde mit Gelretardationsexperimenten untersucht.

Es wurden 100 pmol HIV-TAR-RNA mit [γ -³²P]ATP am 5'-Ende unter Einsatz von T4-Polynukleotidkinase in einem Volumen von 10 μ l markiert (Kap. 4.12.2), der Ansatz mit H₂O auf 50 μ l aufgefüllt und über eine Micro-Bio-Spin Säule gereinigt (Kap. 4.16.2). Die Markierungseffizienz wurde in einem denaturierenden Harnstoff-PAGE (Kap. 4.8.2) überprüft.

In 20 μ l Endvolumen wurden die Proteine mit der markierten HIV-TAR-RNA in Bindungspuffer (EK: 30 mM Tris/HCl, pH 7,5, 70 mM KCl, 0,025 % NP-40, 5,5 mM MgCl₂, 2 mM ZnSO₄, 1,5 mM DTT) gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Die HIV-TAR-RNA wurde in einer Konzentration von 0,025 μ M, das Protein in einer Konzentrationen von 0,5 μ M eingesetzt. Die Trennung der Reaktionspartner erfolgte durch native Gelelektrophorese (Kap.4.8.3).

4.23 Kernspinresonanzspektrometrie

Die Aufnahme aller Spektren erfolgte an Varian Unity INOVA Spektrometern (Varian, Palo Alto, Kalifornien, USA) bei Protonenfrequenzen von 600 MHz und 750 MHz.

4.23.1 Probenvorbereitung

TAR-RNA wurde in einem Puffer bestehend aus 5 mM Kaliumphosphat, 50 mM NaCl, pH 6,5 gelöst und auf eine Konzentration von 400 μ M eingestellt. Peptide wurden im gleichen Puffer in einer Konzentration von 2 mM gelöst. Die TAR-RNA-Stammlösung wurde 3 min

lang bei 90 °C inkubiert und durch abkühlen auf Eis in den nativen, monomeren Zustand gefaltet. Für die Messung wurde die TAR-RNA auf eine Konzentration von 100 µM in 5 mM Kaliumphosphat, 50 mM NaCl, pH 6,5 verdünnt, mit 5 % D₂O versetzt und anschließend in NMR-Spezialröhrchen (Wilmad, Buena, New Jersey, USA) überführt.

4.23.2 Messbedingungen

Die eindimensionalen NMR-Protonen-Spektren wurden im Phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion aufgenommen. Die Unterdrückung der Wasserresonanz erfolgte durch die Verwendung der WATERGATE (Piotto et al., 1992) Pulssequenz. Die Eichung der ppm-Skala erfolgte extern auf den Standard 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS) (Markley et al., 1998). Die Temperatur betrug konstant 298 K.

Die Spektren bei 750 MHz wurden mit 3600 komplexen Datenpunkten und einer spektralen Weite von 18000 Hz aufgenommen, Spektren bei 600 MHz wurden mit 2801 Datenpunkten und einer spektralen Weite von 14000 Hz aufgenommen. Sofern das Verhältnis von Signal zu Rauschen ausreichend war, wurden 512 Wiederholungen („Scans“) akkumuliert, andernfalls wurden 8 k Wiederholungen durchgeführt.

Prozessierung: Nach Multiplikation mit einer phasenverschobenen Sinusfunktion und entsprechendem Auffüllen mit Nullen („Zerofilling“) wurden nach einer Fouriertransformation 64 k reelle Datenpunkte erhalten. Nach Phasen- und Basislinien-Korrektur konnten die Spektren ausgewertet werden. Die gesamte Prozessierung erfolgte mit der VNMR-Software (Varian, Palo Alto, Kalifornien, USA).

4.24 Selektionsprozeduren

4.24.1 Phagenselektion mit SA-Magnetkügelchen

Als eine Weiterentwicklung des Biopannings kann die von Laird Offringa und Belasco (1995) beschriebene Selektionsprozedur mit Streptavidin (SA) beschichteten Magnetkügelchen (SA-MPG) angesehen werden. Die Methode wurde in einigen Punkten modifiziert und wurde nur für die Selektion von pAK-Phagen verwendet.

Es wurden je 40 µl der SA-MPG-Lösung in einer Mikrotiterplatte magnetisch separiert (96well Magnet, Qiagen, Hilden), der Überstand verworfen und einmal mit 100 µl Bindungspuffer gewaschen. Die Kügelchen wurden anschließend durch Zugabe von 100 µl Blocking-Lösung (1 % acetyliertes BSA in Bindungspuffer) für eine Stunde unter Schütteln bei RT blockiert. Es wurde magnetisch separiert, die Blockierlösung abgezogen und fünfmal mit 100 µl Bindungspuffer überschüssiges BSA abgetrennt. In der Zwischenzeit wurde 5'-biotinylierte HIV-TAR mit einer Konzentration von 1 µM durch dreiminütiges Erhitzen und schnelles Abkühlen auf Eis renaturiert. Zu 44 µl Bindungspuffer wurden 1 µl rRNasin (3U) und 5 µl gefaltete 5'-biotinylierte HIV-TAR (EK: 500 nM) gegeben. Diese Lösung wurde zu

den gewaschenen SA-MPG-Kügelchen pipettiert und für 20 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit jeweils 100 µl Bindungspuffer sollte gewährleistet werden, dass eventuell durch Abspaltung des Biotin-Linkers entstandene freie HIV-TAR aus dem Ansatz entfernt wurde. Zu den 5'-Biotin-HIV-TAR-SA-MPG-Kügelchen wurde ein Gemisch aus 27 µl Bindungspuffer, 1 µl DTT (50 mM), 1 µl Gesamt-RNA aus Hefe (4,5 mg/ml), 1 µl rRNasin (3U) und 20 µl PEG-gefällte Phagenpartikel (aufgenommen in Bindungspuffer, ca. 10^{11} Partikel) gegeben und 30 min bei RT leicht geschüttelt. Sollte die Selektion in Gegenwart von Cyclin T1 stattfinden, wurden nur 22 µl Bindungspuffer und zusätzlich 5 µl Cyclin T1- Lösung (1mg/ml His-Cyclin T272Δ in Bindungspuffer) eingesetzt. Nicht gebundene Phagen wurden anschließend durch fünfzehnmaliges Waschen mit 100 µl Waschpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 6,9, 100 mM NaCl, 1 % (w/v) Milchpulver, 0,5 % (v/v) Tween 20) und dreimaliges Waschen mit 100 µl Bindungspuffer eliminiert. Gebundene Phagenpartikel konnten durch Zugabe von 100 µl 0,1 M Triethylamin für 20 min bei RT eluiert werden. Das Triethylamin wurde durch die Zugabe von 100 µl 1 M Tris/HCl, pH 8,0 neutralisiert. Die Phagen konnten direkt zur Infektion von Bakterienzellen eingesetzt werden. Das Phageneluat wurde zu 5 ml *E. coli* XL 1 Blue in der logarithmischen Wachstumsphase gegeben und 30 min ohne Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die infizierten Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4 °C), in 1 ml LB- Medium resuspendiert und Aliquote von 250 µl auf LB-Platten mit Chloramphenicol, Tetracyclin und 1 % Glukose ausplattiert. Die Bestimmung des Bakterientiters erfolgte wie in Kap. 4.2 beschrieben. Die über Nacht gewachsenen Klone konnten entweder zur Produktion neuer pAK-Phagen für eine zweite Selektionsrunde vereinigt oder zur Präparation der pAK-DNA für die Sequenzierung eingesetzt werden (Kap. 4.11.1).

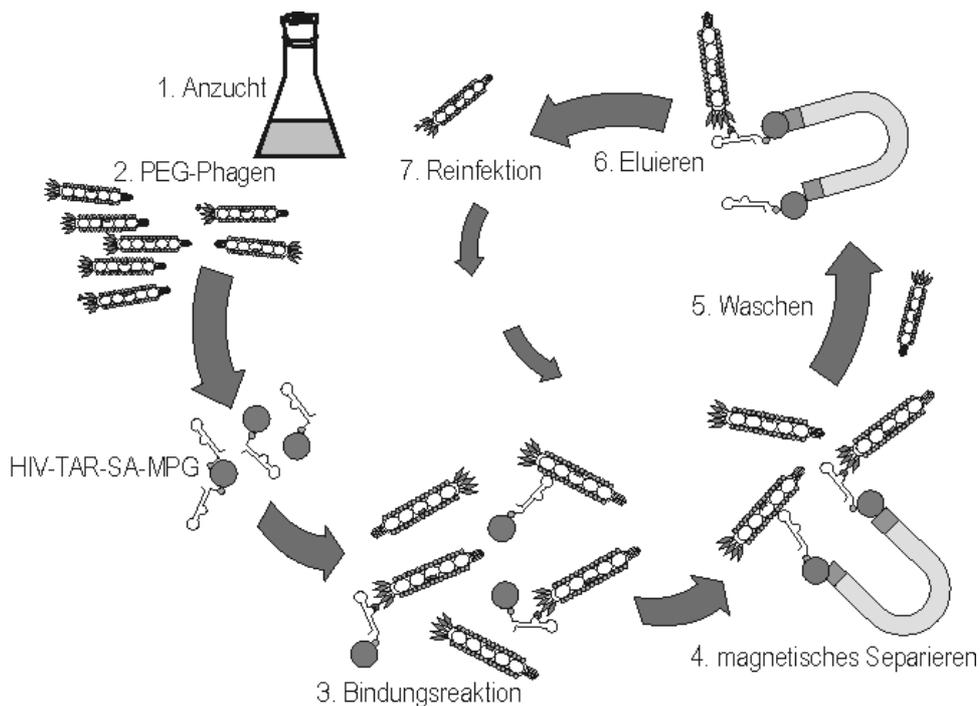


Abbildung 4-1: Schematischer Ablauf einer Phagenselektion mit Streptavidin beschichteten Magnetkügelchen (SA-MPG). Phagen werden in *E. coli* F⁺-Stämmen propagiert und anschließend mit Polyethylenglykol (PEG) präzipitiert. Das Rezeptormolekül (5'-biotinylierte HIV-TAR) wird über eine Streptavidin (SA)-Kopplung an magnetische, poröse Glaskügelchen (MPG) gebunden (HIV-TAR-SA-MPG). Zu den mit HIV-TAR beschichteten Kügelchen wird ein Pool von im Gp3-Fusionsprotein voneinander abweichender Virionen gegeben. HIV-TAR-bindende Phagen werden durch magnetische Separation von einem Überschuss nicht bindender Partikel abgetrennt. Durch Waschschrte kann die Anzahl der unspezifisch an das Rezeptormolekül angelagerten Phagen verringert werden. Schließlich werden die Phagenpartikel vom Rezeptor eluiert, in Bakterien vermehrt und beliebig vielen weiteren Selektionsrunden unterworfen.

Sollte die relative Bindungsfähigkeit von Phagenvarianten bestimmt werden, so wurde das Experiment analog durchgeführt und es wurde vor und nach der Bindung der Phagen an HIV-TAR-SA-MPG der Phagentiter bestimmt.

4.24.2 Selektion in SA-beschichteten Röhrcchen

Diese Selektionsmethode entspricht einer Modifikation der in Kap.4.24.1 beschriebenen Methode zu Selektion an SA-MPG-Kügelchen. In die bereits blockierten Röhrcchen wurden 50 pmol 5'-biotinylierte, gefaltete HIV-TAR in 500 µl Bindungspuffer pipettiert. Zusätzlich wurden 2 µl (6U) rRNasin zugegeben und der Ansatz 20 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Ungebundene HIV-TAR wurde durch dreimaliges Waschen mit 1 ml Bindungspuffer entfernt. Für die Selektion mit pAK-Phagen wurden ca. 1×10^{11} PEG-gefällte Phagen und 2 µl rRNasin in 500 µl Bindungspuffer mit 1 mM ZnSO₄ und 5 mM DTT in die Röhrcchen gegeben. Sollte in Gegenwart von CyclinT1 selektiert werden, wurden noch 20 µl CyclinT1-Lösung (1mg/ml) hinzugegeben. Für die Selektion von M13-Phagen wurden

1×10^{11} PEG-gefällte Phagen und $2 \mu\text{l}$ rRNasin in $500 \mu\text{l}$ in TBS in die Röhren gegeben. Die Bindungsreaktion erfolgte für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln. Nichtgebundene Phagen wurden durch Waschen mit 1 ml Waschpuffer (Bindungspuffer, bzw. TBS mit 0,1 % Tween 20 und $10 \mu\text{g/ml}$ Hefe-tRNA) entfernt. Dabei wurde die Anzahl der Waschschritte mit steigender Anzahl der Selektionsrunden erhöht. Zum Abschluss wurde noch zweimal mit Bindungspuffer gewaschen und anschließend mit $500 \mu\text{l}$ 0,1 M Triethylamin für 20 min bei RT eluiert. Die eluierten Phagen wurden mit $500 \mu\text{l}$ 1 M Tris/HCl, pH 8,0, neutralisiert. Bei pAK-Phagen erfolgte die Infektion der Bakterien wie in Kap. 4.24.1 beschrieben. Die Amplifizierung der M13-Phagen erfolgte in einer 20 ml Kultur wie in Kap. 4.3.1 beschrieben.

5 Experimente und Ergebnisse

Mit Hilfe von Phagen-Display-Experimenten sollte die Bindung von HIV-Tat an TAR-RNA untersucht werden. Der basischen Sequenzdomäne von HIV-Tat wird ein entscheidender Einfluss bei der Wechselwirkung mit HIV-Tat zugewiesen (Kap. 1.6). Als Vektorsystem für die Präsentation von HIV-Tat (1-72) wurde das Phagemid pAK200 verwendet (Krebber et al., 1996b). Dieser Display-Vektor vom Typ 3+3 ist bereits erfolgreich für die *in vitro* Selektion von HIV-Tat verwendet worden (Hoffmann & Willbold, 1997). Auf der Grundlage des Tat-Phagen-Display-Systems sollte nun die Rolle der basischen Aminosäuren von HIV-Tat für die Affinität und Spezifität der Bindung an HIV-TAR-RNA untersucht werden. Nachdem Cyclin T1 als ternärer Kofaktor für die affine und spezifische HIV-Tat-TAR-Bindung identifiziert wurde (Wei et al., 1998), sollte nun ein funktionelles ternäres Phagen-Display System entwickelt werden. Aus früheren Ergebnissen in der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass Cyclin T1 im Phagen-Display als Kofaktor eingesetzt werden kann, allerdings wurden diese Experimente unter suboptimalen Bedingungen durchgeführt und waren daher nicht für eine Auswertung geeignet.

5.1 Ternäres Phagen-Display für die Bindung von HIV-Tat an TAR-RNA in Gegenwart von Cyclin T1

Für die Entwicklung eines funktionellen ternären Phagen-Display-System wurde die relative Bindungsfähigkeit von pAK-*tat*-wt im Vergleich zu pAK-*tat*-mt8bas bestimmt. Diese Experimente sollten in Abwesenheit und in Anwesenheit von Cyclin T1 durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob der Kofaktors auch im Phagen-Display die Affinität und Spezifität der HIV-Tat-TAR-Bindung erhöht.

5.1.1 Konstruktion von pAK-*tat*-mt8bas

Um den Einfluss der gesamten basischen Sequenzdomäne von HIV-Tat auf die Bindung an TAR-RNA zu untersuchen, wurde eine neue Tat-Variante konstruiert, in der alle basischen Aminosäurereste dieser Domäne in einer Kassettenmutagenese (Kap. 4.15) durch Alanine ersetzt wurden. Für die Mutagenese von R49, K50, K51, R52, R53, R55, R56 und R57 wurde pAK-*tat*-wt(E/E) mit *Eco*O109I restrigiert und mit einem 500-fachen Überschuss einer Oligonukleotidkassette aus den annealten Oligonukleotiden pAKmt8bas-5(+) und pAKmt8bas-3(-) ligiert (Kap. 4.12.4). Positive Klone zeigten in einer Kolonie-PCR (Kap. 4.14.2) mit den Primern PAKseq-pelB(+) und PAKseq-gp3(-) ein 345 bp langes Fragment. Die korrekte Nukleotidsequenz wurde durch Sequenzierung (Kap. 4.17) überprüft. Abbildung

5.1.2 Reinigung von HisCycT1-272Δ

Für die Bestimmung der relativen Bindungsfähigkeit der Phagenpartikel in Gegenwart von Cyclin T1 wurde das Fragment CyclinT272Δ eingesetzt, welches die N-terminalen 272 Aminosäuren des gesamten Cyclin T1 aufweist. Dieses Fragment besitzt die gleiche Aktivität in Bezug auf die Bindung an HIV-Tat, wie das Gesamtprotein (Ivanov et al., 1999). Um zu gewährleisten, dass eine in den Bindungsstudien beobachtete Steigerung der Affinität und Spezifität der HIV-Tat-TAR-Bindung nicht durch den GST-Fusionspartner des verwendeten GST-CyclinT272Δ beeinträchtigt wird, sollte für weitere Experimente Cyclin T1, welches die Aminosäuren 1-272 beinhaltet und mit einem Hexahistidin-Anhang am N-terminalen Ende versehen war (HisCycT1-272Δ) verwendet werden. Durch die Kürze des Hexahistidinanhangs im Vergleich zur GST-Fusion sollte eine Verfälschung der Ergebnisse vermieden werden. Das Plasmid pHisCycT1-272Δ (Kap. 3.2) wurde nach der CaCl₂-Methode (Kap. 4.18.1) in den *E.coli*-Stamm BL21RIL(DE3) übertragen. Anschließend wurden die das Plasmid tragenden Bakterien wie unter Kap. 4.1 beschrieben in einem Volumen von 1000 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Tetracyclin) angezogen. Der Zellaufschluss und die Reinigung wurde wie in Kap. 4.20.3 beschrieben durchgeführt. Die Elution erfolgte in 50 Fraktionen mit jeweils 3 ml Volumen. Die Analyse der Reinigung von HisCycT1-272Δ erfolgte durch ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 4.8.4) und ist in Abbildung 5-2 aufgezeigt.

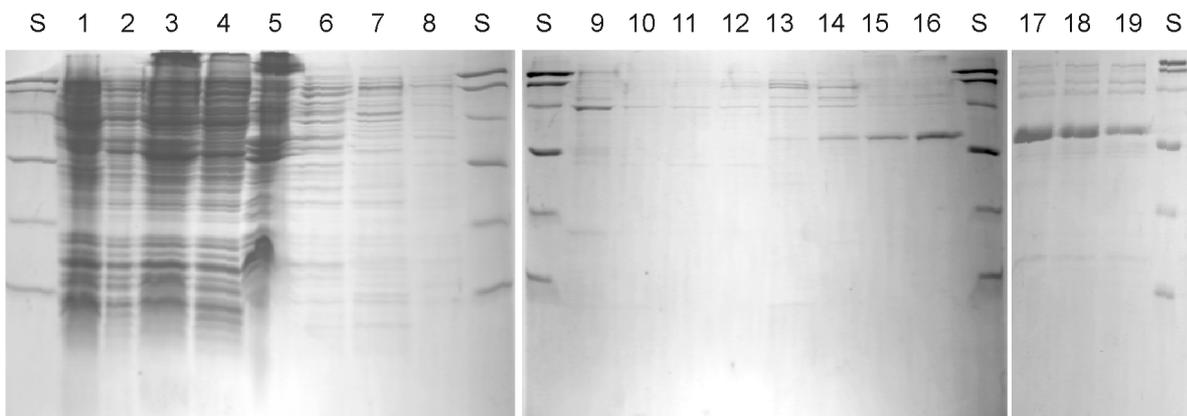


Abbildung 5-2: Analyse der Reinigung von HisCycT1-272Δ mittels eines 15 %igen SDS-Polyacrylamidgels. Aufgetragen sind: (S) 10 µl BioRad Low Range Standard (Kap. 4.8.4) (1) 10 µl Zellen vor Induktion des T7-Promotors (2) 10 µl Zellen nach Induktion (3) 10 µl Rohextrakt (4) 10 µl Überstand nach Zentrifugation (5) 5 µl Pellet nach Zentrifugation (6)-(10) je 20 µl Waschfraktion 1-5 (11)-(19) je 20 µl der Eluatfraktionen 10, 15, 20, 25, 30, 35, 38, 40, 42

Es zeigt sich, dass HisCycT1-272Δ in mindestens 90 %iger Reinheit erhalten werden konnte. Für die gewünschten Experimente war diese Reinheit ausreichend und so wurde auf weitere

Reinigungsschritte verzichtet. Das Fusionsprotein lag nach dem Zellaufschluss in löslicher Form vor, allerdings wurde es nur in sehr geringem Maße exprimiert. Nach der Elution wurden die Fraktionen 30 bis 42 vereinigt. Das Protein wurde mit Hilfe einer NAP25 Säule in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 umgepuffert (Abbildung 5-3) und anschließend lyophilisiert. Es konnten 1,5 mg reines HisCycT1-272 Δ aus einem Liter Kultur gereinigt werden.

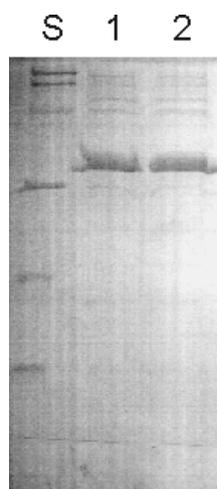


Abbildung 5-3: Analyse des abschließenden Reinigungsschrittes von HisCycT1-272 Δ mittels eines 15 %igen SDS-Polyacrylamidgels. Um das Imidazol aus der Lösung zu entfernen, wurden die vereinigten HisCycT1-272 Δ beinhaltenen Eluate über eine NAP25 Säule umgepuffert. Aufgetragen sind jeweils 20 μ l Proteinlösung vor (1) und nach (2) der NAP25 Säule. (S) BioRad Low Range Standard (Kap. 4.8.4)

5.1.3 Bestimmung der relativen Bindungsfähigkeit

Mit Hilfe der neu konstruierten pAK-*tat*-mt8bas Mutante und mit pAK-*tat*-wt sollte nun die Funktionalität des Phagen-Display Systems durch Bestimmung der relativen Bindungsfähigkeit der Phagen überprüft werden. Das Experiment wurde wie in Kap. 4.24.1 beschrieben durchgeführt. Die Elution mit 100 mM Triethylamin (TEA) führte zur vollständigen Hydrolyse der RNA. Dadurch war gewährleistet, dass alle Phagen eluiert wurden, die an die TAR-RNA gebunden waren. Es wurde die Bindung an 5'-biotinylierte, über Streptavidin immobilisierte HIV-TAR bestimmt. Die dabei verwendete HIV-TAR entsprach dem Minimalelement für die Bindung von Tat (Kap. 1.6.2). Vor und nach der Bindung an TAR wurde der Phagentiter ermittelt (Kap. 4.3.5) und so der Rückhalt der Phagen bestimmt, die über HIV-Tat funktionell an HIV-TAR binden. Um zu bestimmen, wie spezifisch die Bindung von HIV-Tat an HIV-TAR ist, wurde die relative Bindungsfähigkeit ebenfalls in Gegenwart von Gesamt-RNA aus Hefe ermittelt. Diese lag in einem 100-fachen Massenüberschuß zur HIV-TAR vor. Der Hintergrund der Bindung, d.h. der Anteil der Phagen, die unspezifisch an 5'-biotinylierte HIV-TAR-Streptavidin-beschichtete-Magnetkügelchen (HIV-TAR-SA-MPG) binden, wurde durch Messung des Rückhalts von

pAK200-Phagen, die kein Tat präsentieren, bestimmt. Die Bindungsfähigkeit wurde dann auf den mit pAK200-Phagen erhaltenen Wert normiert. Zur Überprüfung des Einflusses von Cyclin T1 auf die HIV-Tat-TAR-Bindung wurden die Experimente gleichfalls in Gegenwart von HisCycT1-272 Δ durchgeführt. Jedes Experiment wurde acht mal wiederholt. In Abbildung 5-4 sind die Mittelwerte der Ergebnisse und die Standardabweichung zusammengefasst.

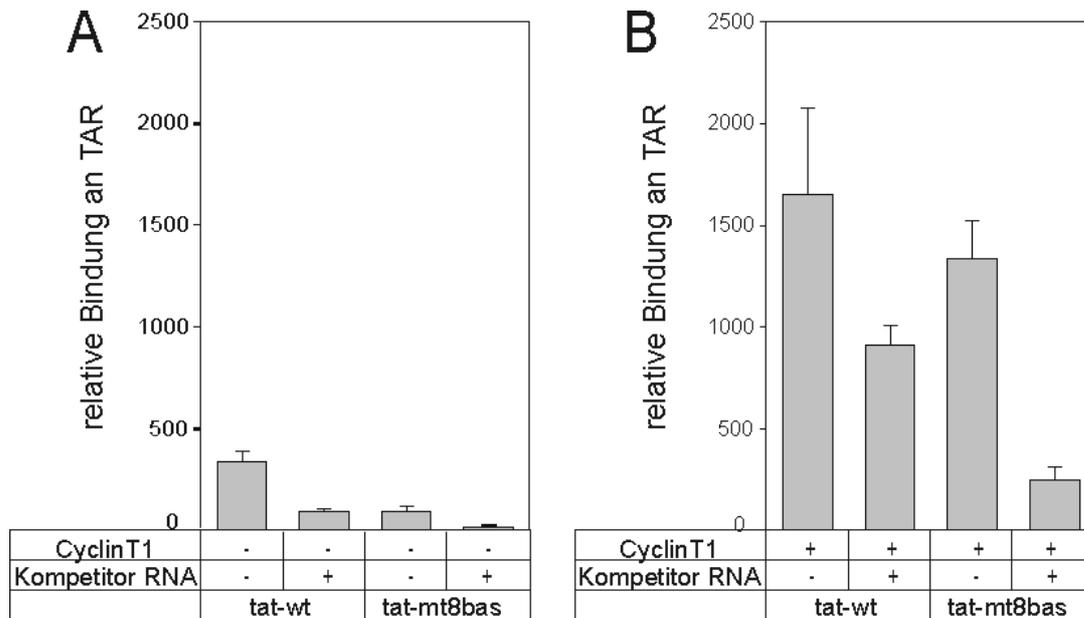


Abbildung 5-4: Relative Bindungsfähigkeit verschiedener pAK-tat-Phagen an 5'-biotinylierte, über Streptavidin immobilisierte HIV-TAR. Aufgetragen ist die relative Bindung an HIV-TAR jeweils in Anwesenheit (A) und in Abwesenheit (B) von HisCycT1-272 Δ . Beide Experimente wurden sowohl mit und ohne die Gegenwart von unspezifischer Kompetitor-RNA in einem 100-fachen Massenüberschuss durchgeführt.

Tat-wt präsentierende Phagen binden 300-fach besser an TAR-RNA, als Phagen, die kein Tat auf ihrer Oberfläche präsentieren. Durch den Austausch von allen acht basischen Resten des ARMs wird die Bindung von Tat um das 3,5-fache in Abwesenheit, und um das 4,7-fache in Anwesenheit eines 100-fachen Massenüberschusses an Kompetitor-RNA (Abbildung 5-4A). Die Gegenwart von Cyclin T1 steigert sowohl bei Tat-wt-, als auch bei Tat-mt8bas-präsentierenden Phagen die relative Bindungsfähigkeit um eine Größenordnung (Abbildung 5-4B). Cyclin T1 erhöht die HIV-TAR-Bindung bei Tat-präsentierenden Phagen sehr spezifisch. Die Spezifität der Bindung wird vor allem deutlich durch den Vergleich der Bindungsfaktoren in Anwesenheit eines 100-fachen Massenüberschusses an unspezifischer Kompetitor-RNA und der Bindungsfaktoren ohne unspezifische RNA. In Abbildung 5-5 ist das Verhältnis der Bindungsfaktoren der beiden Experimente zueinander aufgetragen. Es zeigt sich, dass für die Spezifität der HIV-TAR-Bindung sowohl Cyclin T1, als auch das ARM notwendig ist.

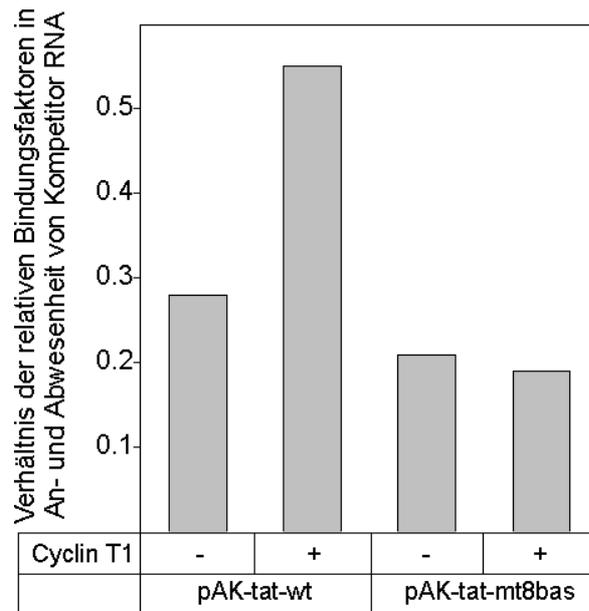


Abbildung 5-5: Bindungsspezifität von Tat-präsentierenden Phagen. Dargestellt sind die Verhältnisse der relativen Bindungsfaktoren in Anwesenheit und in Abwesenheit eines 100-fachen Überschusses an Kompetitor-RNA für Tat-wt- und Tat-mt8bas präsentierende Phagen.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Änderungen bzgl. der HIV-TAR-Bindung durch Tat-präsentierend Phagen tatsächlich durch Cyclin T1 bewirkt werden, wurden die relativen Bindungsfaktoren für Tat-wt-präsentierende Phagen in Anwesenheit verschiedener Mengen von HisCycT1-272 Δ bestimmt (Abbildung 5-6). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die HIV-TAR-Bindung der Phagen in Dosisabhängigkeit zu HisCycT1-272 Δ stehen. Diese Dosisabhängigkeit zeigt, dass diese Spezifitätserhöhung durch Cyclin T1 verursacht wird.

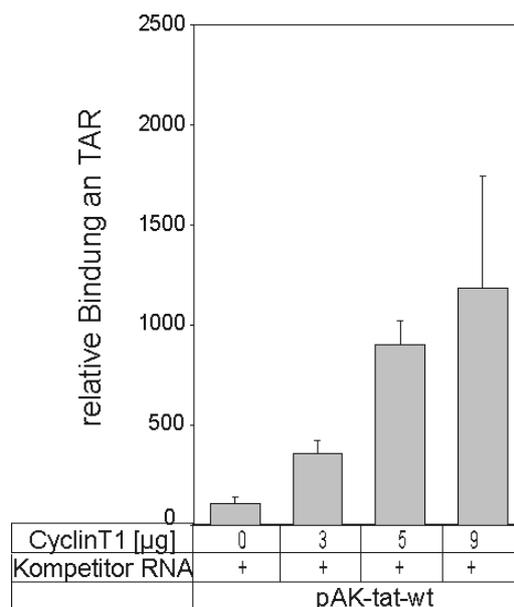


Abbildung 5-6: Cyclin T1 Dosisabhängigkeit der HIV-TAR-Bindung durch Tat-präsentierende Phagen. Die relativen Bindungsfaktoren wurden in Anwesenheit eines 100-fachen Massenüberschusses an unspezifischer RNA und verschiedenen Mengen von HisCycT1-272 Δ bestimmt.

5.1.4 Testselektion mit den Varianten pAK-*tat*-wt und pAK-*tat*-mt8bas

Für die Überprüfung der Funktionalität des ternären Phagen-Display-Systems unter Selektionsbedingungen wurde zunächst eine Testselektion durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine einfache Selektionsprozedur, in der festgestellt werden sollte, ob sich *Tat*-wt aus einem hohen Überschuss an *Tat*-mt8bas anreichern lässt. Die Selektion wurde wie in Kap. 4.24.1 beschrieben in Gegenwart eines 100-fachen Überschuss an Gesamt-RNA aus Hefe, sowie in An- und Abwesenheit von Cyclin T1 durchgeführt. In der ersten Runde der Selektion wurden dabei ca. 1×10^{11} Phagen eingesetzt. Dies war eine Mischung, die in einem Verhältnis von 1:5000 aus pAK-*tat*-wt-Phagen und aus pAK-*tat*-mt8bas-Phagen bestand. Es wurde über drei Runden selektiert und nach jeder Selektionsrunde wurde der Anteil an *Tat*-wt-tragenden Phagen durch eine PCR-Produktlängen-Analyse bestimmt. Dazu wurden jeweils 46 zufällig ausgewählte, unabhängige Klone in zwei verschiedenen Kolonie-PCRs (Kap. 4.14.2) überprüft, wobei mit jeweils einem Klon beide PCR-Reaktionen angesetzt wurden. Eine PCR wurde mit dem Primerpaar PAKseq-pelB(+)/ PCR-WT(-) durchgeführt. Handelte es sich dabei um einen *Tat*-wt-Klon, so ergab sich ein Produkt von 156 bp Länge. Die andere PCR enthielt das Primerpaar PAKseq-gp3(-)/ PCR-8BAS(+) und ergab bei einem *Tat*-mt8bas-Klon ein Produkt von 240 bp Länge. Die Methode ist in Abbildung 5-7 dargestellt.

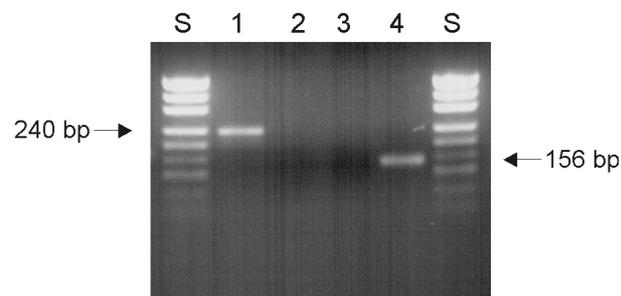


Abbildung 5-7: Beispiel für die PCR-Produktlängenanalyse. (1, 2) Als Template für die PCR diente pAK-*tat*-wt. (3, 4) pAK-*tat*-mt8bas wurde als Template eingesetzt. (1, 3) PCR mit dem Primerpaar PAKseq-pelB(+)/ PCR-WT(-) (2, 4) PCR mit dem Primerpaar PAKseq-gp3(-)/ PCR-8BAS(+).

Im Folgenden sind die gesamten Ergebnisse der PCR-Produktlängenanalyse einer jeden Selektionsrunde zusammengefasst.

Tabelle 5-1: Ergebnis der PCR-Produktlängenanalyse für die Selektionen in Abwesenheit (Selektion A) und Anwesenheit (Selektion B) von HisCycT1-272Δ nach jeder Selektionsrunde. Gestartet wurde mit einem 5000-fachen Überschuss an pAK-*tat*-mt8bas-Phagen. Es wurden jeweils 46 Klone untersucht.

Selektion A	<i>tat</i> [%]	<i>tat</i> -mt8bas [%]	Selektion B	<i>tat</i> [%]	<i>tat</i> -mt8bas [%]
Runde 1	0	100	Runde 1	8,7	91,3
Runde 2	15,2	84,8	Runde 2	6,5	93,5
Runde 3	41,3	48,7	Runde 3	17,4	82,6

Der Verlauf der Selektion und die Anreicherung von Tat-wt-präsentierenden Phagen die sich aus der PCR-Produktlängenanalyse ergibt, ist in Abbildung 5-8 zum Vergleich grafisch dargestellt. Nach drei Runden Selektion waren die pAK-*tat*-wt-Phagen auf ein Verhältnis von 1:5 (20 %) in Anwesenheit von Cyclin T1 und auf ein Verhältnis von 1:2,5 (40%) in Abwesenheit von Cyclin T1 angereichert. Dies entspricht einer 1000-fachen, bzw. 2000-fachen Anreicherung nach drei Runden Selektion. Über diese drei Selektionsrunden gemittelt entspricht die jeweilige dritte Wurzel dieses Wertes dem Anreicherungsfaktor für jeden Selektionsschritt. Für eine Selektion in Gegenwart von Cyclin T1 ergibt sich demnach ein Anreicherungsfaktor von 10,0, für die Selektion ohne Cyclin T1 errechnet sich ein Anreicherungsfaktor von 12,6.

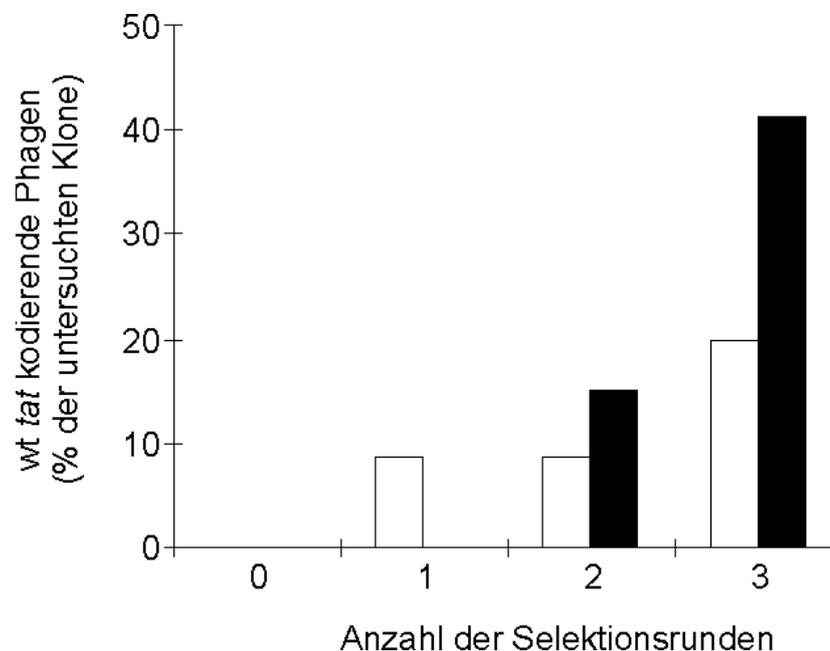


Abbildung 5-8: Anreicherung von HIV-*tat*-wt-präsentierenden Phagen aus einem 5000-fachen Überschuss an HIV-*tat*-mt8bas präsentierenden Phagen. Aufgetragen sind die Werte aus der PCR-Produktlängenanalyse. Die Selektion wurde in Anwesenheit (weiße Balken) und in Abwesenheit (schwarze Balken) von HisCycT1-272Δ durchgeführt.

5.2 Konstruktion mehrerer pAK-*tat*-random Bibliotheken

Nachdem nachgewiesen war, dass sich das phagenpräsentierende Tat-Selektionssystem auch als ternäres System anwenden lässt und sich Tat-wt-präsentierende Phagen aus einer Mischung mit Tat-mt8bas-präsentierenden Phagen anreichern lassen, sollte nun die Rolle der einzelnen Aminosäurereste der basischen Sequenzdomäne für die HIV-Tat-TAR Bindung untersucht werden. Den Aminosäuren G48 bis R57 wird ein großer Anteil an der für HIV-Tat beobachteten HIV-TAR-Bindungsaktivität (Kap.1.6.) zugeschrieben. Da nicht alle zehn Reste

der basischen Sequenzdomäne durch die Konstruktion einer einzelnen Bibliothek vollständig randomisiert werden können (entsprechend $1,1 \times 10^{15}$ unabhängigen Klonen), wurden in einer Bibliothek die Aminosäuren R49, K50, K51 und R52, sowie in einer anderen die Aminosäuren R53, R55, R56 und R57 randomisiert. Bei der Konstruktion sollten die jeweiligen Aminosäuren auf Nukleotidebene durch das Triplet NNK (N: beliebige Base, K: G oder T) kodiert werden. Damit ergaben sich für jede randomisierte Position 32 Möglichkeiten. Somit werden manche Aminosäuren durch drei (Arginin, Leucin, Serin), andere durch zwei (Prolin, Alanin, Valin, Threonin und Glycin) und alle anderen Aminosäuren durch ein Triplet kodiert. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine bestimmte Aminosäure in eine beliebige NNK-Bibliothek eingebaut wird, liegt demnach je nach Aminosäurerest zwischen $1/32$ und $3/32$ (siehe Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2: Überblick über die Kodonwahrscheinlichkeiten (c_w) der einzelnen Aminosäuren (aa) bei der Verwendung des Triplets NNK für die Randomisierung (N:beliebige Base; K: G oder T).

aa	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	*
c_w	$\frac{2}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{2}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{3}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{2}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{3}{32}$	$\frac{3}{32}$	$\frac{2}{32}$	$\frac{2}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$

Demnach müssten in einer optimalen Bibliothek, in der jede mögliche Kombination von Aminosäuren an diesen Positionen mit einer Wahrscheinlichkeit von 75 % enthalten sind, eine Größe von 32^4 (entsprechend 1×10^6) unabhängige Klone betragen.

Als Ausgangsvektor für die beiden Bibliotheken diene pAK-*tat*-wt-Amp(E/E). Dieser Vektor besitzt innerhalb des *tat*-Gens ein über *Eco*O109I-Schnittstellen kloniertes Gen für die β -Lactamase („Ampicillin-Kassette“) mit einer Größe von ca. 1 kb. Der Vektor wurde mit *Eco*O109I restrigiert (Kap. 4.12.1) und über ein 0,8%iges Agarosegel gereinigt (Kap. 4.16.1). Dabei erleichtert die Ampicillin-Kassette die Überwachung der Restriktion. Für die Konstruktion der Bibliotheken war es wichtig, nur doppelt restrigierten Vektor einzusetzen, da dadurch eine möglichst hohe Ligationseffizienz erreicht werden kann.

Für die Bereitstellung des *tat*-RKKR-random- und des *tat*-RRRR-random Fragments wurden zwei 75 Nukleotide lange, synthetische Oligonukleotide annealt. Dabei handelte es sich zum einen um die Oligonukleotide PAKlib-RKKR5(+) und PAKlib-RKKR3(+) und zum anderen um die Oligonukleotide PAKlib-RRRR5(+) und PAKlib-RRRR3(+) (Kap. 3.3). Durch das Annealing wurden dsDNA Fragmente erhalten, die die zufällig besetzten Nukleotide für die pAK-*tat*-random-Bibliotheken enthielten. Die resultierenden Fragmente verfügten an beiden Enden die für die Ligation nötigen kohäsiven Enden für *Eco*O109I und waren am 5'-Ende phosphoryliert. Sie konnten daher direkt für die Ligation eingesetzt werden. Um eine möglichst hohe Ligationseffizienz zu erreichen, wurde das Vektor-Insert-Verhältnis für die Ligation mit jeweils 50 ng Vektor optimiert. Die besten Ergebnisse wurden für beide Bibliotheken mit einem Verhältnis von 1:20 erreicht. Zur Konstruktion der pAK-*tat*-RKKR-

random-Bibliothek wurden 1000 ng Vektor-DNA und 380 ng (ca. 8 pmol) *tat*-RKKR-random Fragment in einem Volumen von 400 µl ligiert (Kap. 4.12.4). Der Ligationsansatz wurde in 20 µl Aliquoten einer Mikrodialyse unterzogen (Kap. 4.10.3). In 20 Ansätzen wurden jeweils 80 µl XL1 Blue mit 20 µl der rekombinanten DNA elektroporiert (Kap. 4.18.2). Die Elektroporationsansätze wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in 50 µl Medium vorsichtig resuspendiert. Die Ansätze wurden vereinigt und in 200 µl Portionen auf LB-Platten (34 µl Chloramphenicol, 20 µl Tetracyclin, 1 % Glukose) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Parallel dazu wurde mit einem Aliquot von 20 µl der Bakterientiter bestimmt (Kap. 4.2). Die entstandenen Klone wurden mit wenig LB (34 µl Chloramphenicol, 20 µl Tetracyclin, 1 % Glukose) von der Platte gekratzt und als Glycerinkultur gelagert (Kap. 4.1). Für die Konstruktion der pAK-*tat*-RRRR-random-Bibliothek wurde auf die gleiche Art vorgegangen. Anstelle des *tat*-RRRR-random-Fragments wurde hier das *tat*-RRRR-random Fragment eingesetzt.

Das Tat-Protein an sich weist eine ungerade Anzahl an Cysteinen auf. Um zu überprüfen, ob dies zu einem zusätzlichen Selektionsdruck durch die Bildung von inter- und intramolekularer Disulfidbrücken während der Anzucht im sauerstoffreichen Kulturmedium führt, oder ob die Gegenwart von Cyclin T1(1-272) mit wiederum fünf Cysteinen Auswirkungen auf das Selektionsergebnis hat, wurde eine weitere pAK-*tat*-RRRR-random-Bibliothek auf der Basis von pAK-*tat*-C31S-Amp(E/E) konstruiert. Durch die Annahme, dass die Bindung von Cyclin T1 an HIV-Tat über Zn²⁺-Ionen vermittelt wird (Garber et al., 1998). Damit konnte sicher ausgeschlossen werden, dass im Selektionsergebnis auftretende Cysteine auf eine Selektion zu einem Tat-Protein mit einer geraden Anzahl an Cysteinen zurückzuführen sind. Der Vektor pAK-*tat*-C31S-Amp(E/E) wurde mit *Eco*O109I restrigiert (Kap. 4.12.1) und über ein 0,8 %iges Agarosegel gereinigt (Kap. 4.16.1). Für die Konstruktion einer pAK-*tat*-C31S-RRRR-random-Bibliothek wurde der so gewonnene Vektor pAK-*tat*-C31S-(E/E) mit dem annealten *tat*-RRRR-random Fragment ligiert (Kap. 4.12.4) und für eine möglichst hohe Transformationseffizienz das Vektor-Insert-Verhältnis mit jeweils 50 ng Vektor optimiert. Für diesen Vektor lag es bei einem Verhältnis von 1:25. Zur Konstruktion der pAK-*tat*-C31S-RRRR-random-Bibliothek wurden 1000 ng Vektor-DNA und 480 ng (ca. 10 pmol) *tat*-RKKR-random Fragment in einem Volumen von 400 µl ligiert (Kap. 4.12.4). Danach wurde wie für die beiden pAK-*tat*-wt-Bibliotheken beschrieben vorgegangen.

5.3 Größe und Qualität der pAK-*tat*-Bibliotheken

Für die resultierenden Bibliotheken wurde die Größe und die Qualität bestimmt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass alle vier Aminosäurepositionen vollständig randomisiert wurden, konnte mit (Gleichung 5-1) berechnet werden.

$$P = 1 - \left(1 - \frac{1}{\text{Anzahl der Möglichkeiten}} \right)^{\text{Anzahl der resultierenden Klone}} \quad (\text{Gleichung 5-1})$$

Dabei ist P die Wahrscheinlichkeit für das Wiederauffinden jeder einzelnen möglichen Variante aus der Randomisierung aller vier Aminosäurepositionen. Diese Wahrscheinlichkeit und die Größe der drei konstruierten Bibliotheken sind in Tabelle 5-3 zusammengefasst.

Tabelle 5-3: Zusammenfassung der Quantität der pAK-*tat*-Bibliotheken.

	Größe (Anzahl unabhängiger Klone)	Wahrscheinlichkeit P
pAK- <i>tat</i> -RKKR-random	1,5 x 10 ⁶	78 %
pAK- <i>tat</i> -RRRR-random	1,3 x 10 ⁶	75 %
pAK- <i>tat</i> -C31S-RRRR-random	1,1 x 10 ⁶	67 %

Neben der Quantität musste auch die Qualität der Bibliotheken überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden in einer Kolonie-PCR (Kap. 4.14.2) unabhängige Klone der verschiedenen Bibliotheken untersucht und diese gelelektrophoretisch überprüft (Abbildung 5-9 bis Abbildung 5-11).

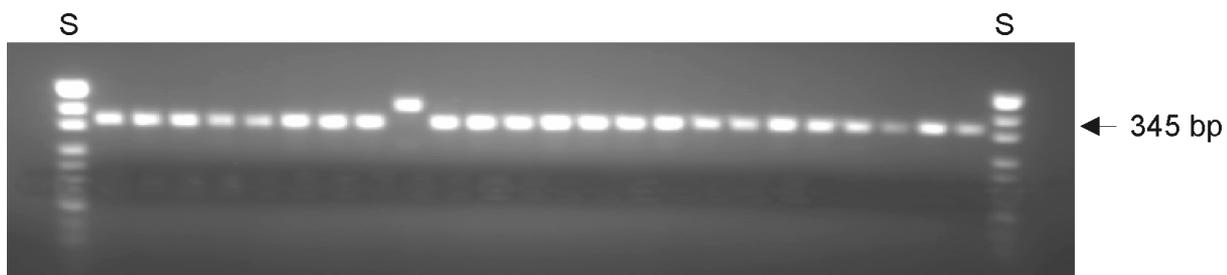


Abbildung 5-9: Kolonie-PCR zur Überprüfung der pAK-*tat*-wt-RKKR-random-Bibliothek. Als Primer wurden PAKseq-pelB(+) und PAKseq-gp3(-) eingesetzt. (1) bis (24) unabhängige pAK-*tat*-wt-RKKR-random-Klone (S) pUC19/*Msp*I-Standard. Die Analyse der Kolonie-PCR (Kap.4.14.2) fand mittels eines 2,5 % Agarosegels statt (Kap.4.8.1).

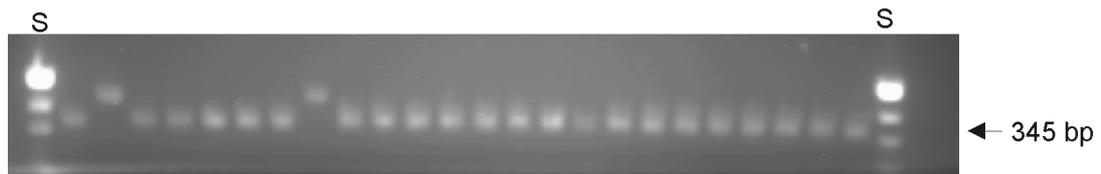


Abbildung 5-10: Kolonie-PCR zur Überprüfung der pAK-*tat*-wt-RRRR-random-Bibliothek. Als Primer wurden PAKseq-pelB(+) und PAKseq-gp3(-) eingesetzt. (1) bis (24) unabhängige pAK-*tat*-wt-RRRR-random-Klone (S) pUC19/*MspI*-Standard. Die Analyse der Kolonie-PCR (Kap.4.14.2) fand mittels eines 2,5 % Agarosegels statt (Kap.4.8.1).

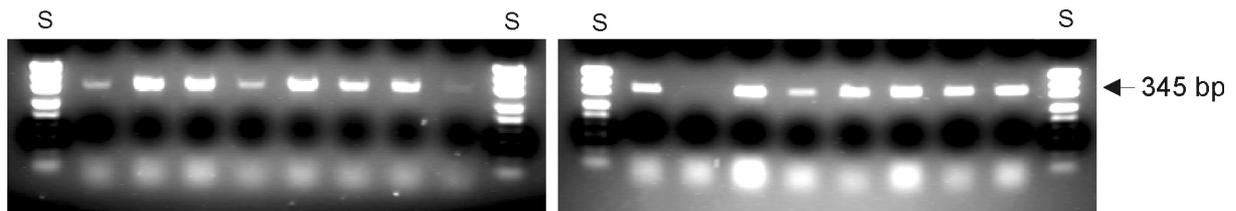


Abbildung 5-11: Kolonie-PCR zur Überprüfung der pAK-*tat*-C31S-RRRR-random-Bibliothek. Als Primer wurden PAKseq-pelB(+) und PAKseq-gp3(-) eingesetzt. (1) bis (16) unabhängige pAK-*tat*-C31S-RRRR-random-Klone (S) pUC19/*MspI*-Standard. Die Analyse der Kolonie-PCR (Kap.4.14.2) fand mittels eines 2,5 % Agarosegels statt (Kap.4.8.1).

Trugen die Zellen ein *tat*-enthaltendes Phagemid, führte die Primerkombination PAKseq-pelB(+)/PAKseq-gp3(-) zur Anreicherung eines 345 bp großen *tat*-Fragments. Das Ergebnis der Überprüfung ist in Tabelle 5-4 zusammengefasst.

Tabelle 5-4: Qualität der pAK-*tat*-Bibliotheken.

	Anzahl untersuchter Klone	Anzahl Klone mit <i>tat</i> - Phagemid	Anteil <i>tat</i> -tragender Phagemide an der Bibliothek
pAK- <i>tat</i> -RKKR-random	24	23	95,8 %
pAK- <i>tat</i> -RRRR-random	24	22	91,7 %
pAK- <i>tat</i> -C31S-RRRR-random	16	15	93,8 %

Um zu überprüfen, dass keine zusätzliche Mutationen eingeführt wurden, und um die Qualität der synthetischen Oligonukleotide zu überprüfen, wurde die Sequenz von 38 unabhängigen pAK-*tat*-wt-RKKR-random-, 20 pAK-*tat*-wt-RRRR-random- und 20 pAK-*tat*-C31S-RRRR-random-Varianten unter Verwendung des Sequenzierprimers PAKseq-pelB(+) bestimmt. Alle sequenzierten Klone präsentierten eine *Tat*-Variante und waren vollständig randomisiert. Die Sequenzen sind im Anhang in Tabelle 11-1 dargestellt. In den folgenden Abbildungen ist die

Verteilung der Aminosäurereste auf den einzelnen Positionen in den verschiedenen Bibliotheken dargestellt.

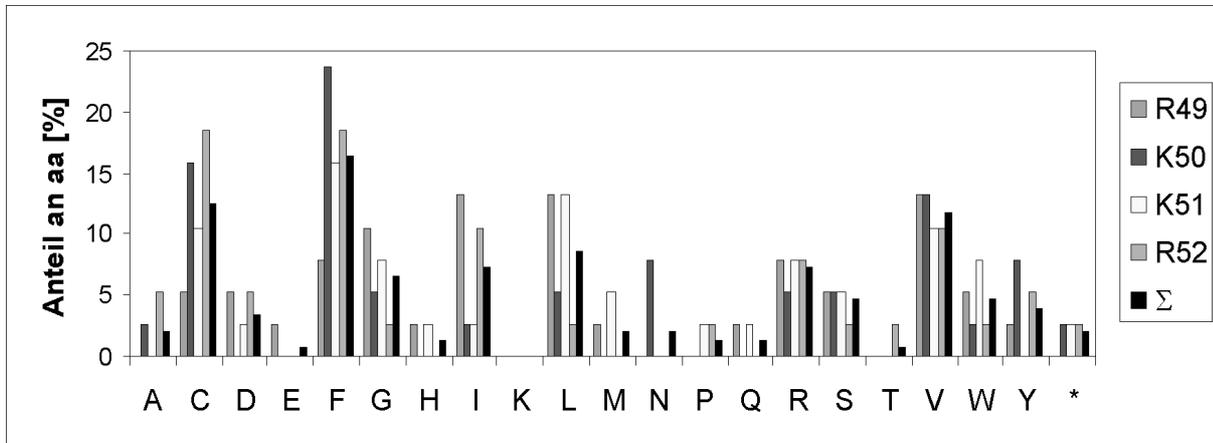


Abbildung 5-12: Verteilung der Aminosäurereste auf den einzelnen Sequenzpositionen der pAK-tat-wt-RKKR-random Bibliothek. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben. Das Stopkodon wird durch (*) gekennzeichnet.

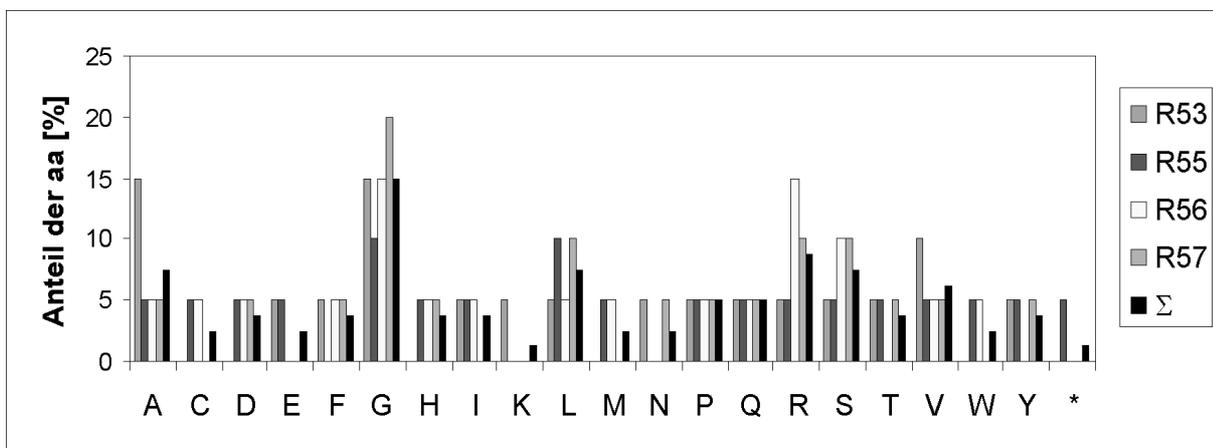


Abbildung 5-13: Verteilung der Aminosäurereste auf den einzelnen Sequenzpositionen der pAK-tat-wt-RRRR-random Bibliothek. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben. Das Stopkodon wird durch (*) gekennzeichnet.

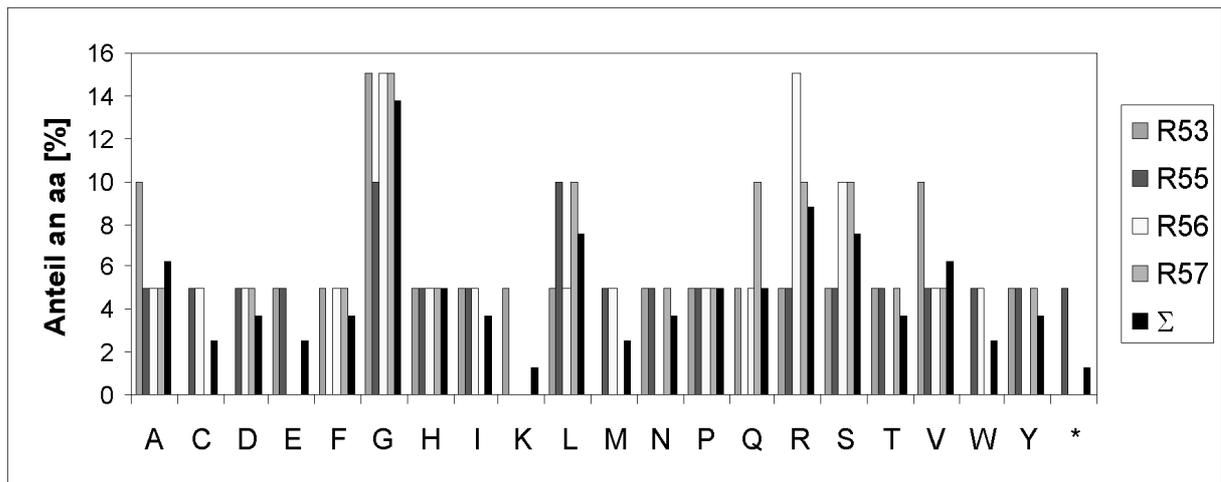


Abbildung 5-14: Verteilung der Aminosäurereste auf den einzelnen Sequenzpositionen der pAK-tat-C31S-RRRR-random Bibliothek. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben. Das Stopkodon wird durch (*) gekennzeichnet.

Neben der Auswertung der tatsächlichen Verteilung der Aminosäurereste auf den einzelnen Aminosäurepositionen wurde die prozentuale Abweichung von der statistisch zu erwartenden Aminosäureverteilung berechnet. Wie bereits beschrieben, sind in einer theoretischen (NNK)₄-Bibliothek die Aminosäuren mit ein bis drei Triplets vertreten. Die prozentuale Abweichung wurde nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Abweichung einer beliebigen aa [\%]} = \left(\frac{\text{Häufigkeit der aa}}{c_w \text{ der aa}} \right) \quad (\text{Gleichung 5-2})$$

Unter der Häufigkeit einer beliebigen Aminosäure ist dabei der Anteil dieser Aminosäure an der Gesamtheit der analysierten Aminosäure zu verstehen. Die Codonwahrscheinlichkeiten (c_w) für die einzelnen Reste enthält Tabelle 5-2. Diese Berechnung wurde nur für die Gesamtheit der randomisierten Aminosäurepositionen einer jeden Bibliothek durchgeführt und nicht für jede einzelne Aminosäureposition.

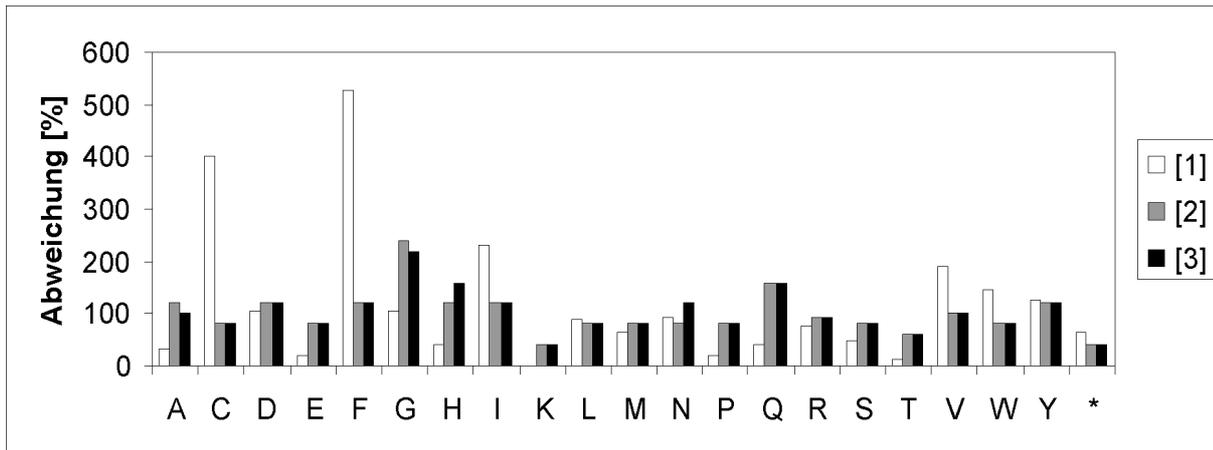


Abbildung 5-15: Prozentuale Abweichung der Tat-random-Bibliotheken von einer (NNK)₄-Bibliothek mit statistischer Aminosäureverteilung. Von der pAK-*tat*-wt-RKKRandom-Bibliothek [1] wurden 38, von der pAK-*tat*-wt-RRRR-Bibliothek [2] wurden 20 und von der pAK-*tat*-C31S-RRRR-Bibliothek [3] wurden ebenfalls 20 unabhängige Klone sequenziert. Für diese Auftragung wurde nicht zwischen den einzelnen Aminosäure-Positionen unterschieden. Die aufgetragenen Werte wurden mit den im Anhang dokumentierten Aminosäuren (Tabelle 11-1) und unter Anwendung von Gleichung 4-2 ermittelt. Eine Anreicherung von 100 % steht für eine statistische Verteilung einer Aminosäure. Ein Wert von 200 % gibt an, dass dieser Rest doppelt so häufig auftritt und ein Wert unter 100 % gibt an, dass eine Aminosäure seltener auftritt, als statistisch zu erwarten. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben. Das Stopcodon ist durch (*) angegeben.

Aus Abbildung 5-15 geht hervor, dass in den beiden Tat-RRRR-random-Bibliotheken keine der 20 Aminosäuren stark überrepräsentiert ist. Die unterschiedliche Verteilung der Reste kann auf die beschränkte Anzahl an sequenzierten Klonen zurückgeführt werden. In der Tat-RKKR-random-Bibliothek liegen die Cysteine und die Phenylalanine stark überrepräsentiert vor. Dies ist auf eine starke Überrepräsentation von Thymidinen auf Nukleotidebene zurückzuführen. Da aber auch mit der Neusynthese des entsprechenden PAKlib-RKKR5(+)-Oligonukleotides kein besseres Ergebnis erreicht wurde, wurde diese Bibliothek zur Selektion eingesetzt.

Es gelang somit die Konstruktion dreier ausreichend großer und diverser Bibliotheken. Diese sollten nun auf die Bindung an HIV-TAR in Anwesenheit und in Abwesenheit des Kofaktors Cyclin T1(1-272) selektiert werden.

5.4 Selektion der pAK-*tat*-Phagen Bibliotheken

Durch Selektion der Tat-random-Bibliotheken auf Bindung an HIV-TAR sollten Phagenvarianten mit einer hohen Affinität bzw. Spezifität zur TAR-RNA angereichert werden. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen an den randomisierten Aminosäurepositionen sollte Rückschlüsse auf die Rolle derjenigen Aminosäuren für die Wechselwirkung zwischen Protein und RNA zulassen.

Die Selektionen wurden sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von Cyclin T1(1-272) wie in Kap. 4.24.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden 50 pmol 5'-biotinylierte-HIV-TAR eingesetzt, bei der Selektion in Anwesenheit des Kofaktors wurden 100 pmol Cyclin T1(1-272) zugegeben. Die Elution der Phagen erfolgte jeweils unspezifisch durch Hydrolyse der TAR-RNA mit Triethylamin (TEA). Um die Spezifität zu erhöhen wurde dem Waschpuffer Gesamt-tRNA aus Hefe (10 µg/ml) zugegeben und die Anzahl der Waschschrte wurde mit steigender Anzahl der Selektionsrunden erhöht (Tabelle 5-5).

Tabelle 5-5: Anzahl der Waschschrte in den einzelnen Selektionsrunden

Selektionsrunde	1	2	3	4	5	6
Waschen mit Bindungspuffer mit Gesamt-tRNA aus Hefe (1 mg/ml)	1 x	3 x	5 x	9 x	12 x	15 x

Es wurden jeweils 6 aufeinanderfolgende Selektionsrunden durchgeführt. Nach Abschluss der letzten Selektionsrunde wurden *E.coli* XL1 Blue Zellen mit den verbleibenden Phagen reinfiziert und auf LB-Platten mit Cm, Tet und 1 % Glukose bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} ausplattiert (Kap. 4.24.2). Von vereinzelt Kolonien wurden Zellen angezogen (Kap. 4.1), die Phagemid-DNA präpariert (Kap. 4.11.1) und diese unter Verwendung von PAKseq-pelB(+) sequenziert (Kap. 4.17).

Das Ergebnis der Sequenzierung nach 6 Runden Selektion ist für jede einzelne Bibliothek in Abbildung 5-16 und Abbildung 5-17 dargestellt.

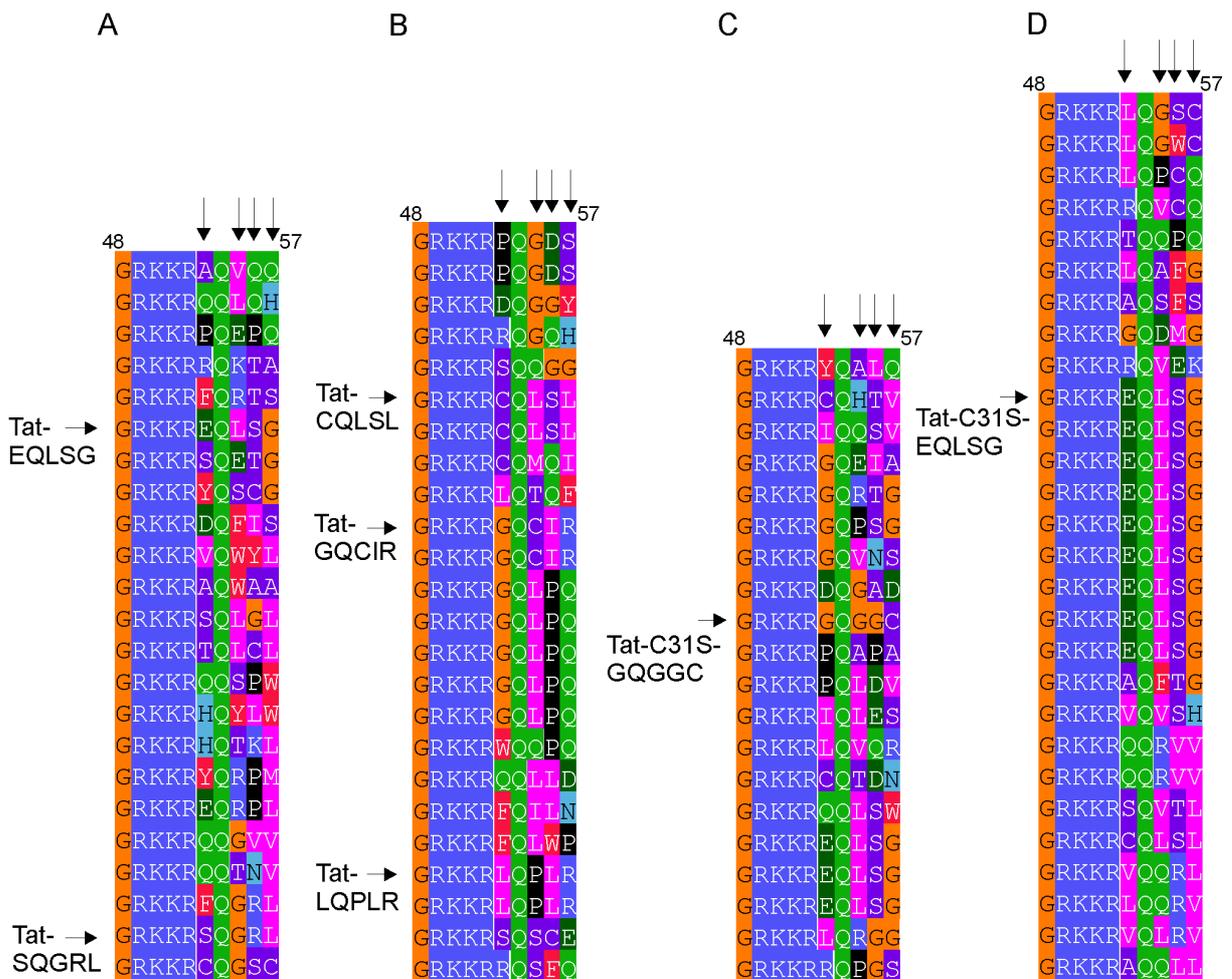


Abbildung 5-17: Ergebnis der Selektion der pAK-tat-wt-RRRR-Bibliothek und der pAK-tat-C31S-RRRR-Bibliothek (A) Ergebnis der Selektion der pAK-tat-wt-Bibliothek in Abwesenheit von Cyclin T1(1-272), (B) Ergebnis der Selektion der pAK-tat-wt-Bibliothek in Anwesenheit von Cyclin T1(1-272), (C) Ergebnis der Selektion der pAK-tat-C31S-Bibliothek in Abwesenheit von Cyclin T1(1-272), (D) Ergebnis der Selektion der pAK-tat-C31S-Bibliothek in Anwesenheit von Cyclin T1(1-272). Dargestellt ist jeweils die gesamte basische Sequenzdomäne. Die randomisierten Aminosäurepositionen sind mit einem vertikalen Pfeil gekennzeichnet. Des Weiteren sind die Sequenzen mit einem horizontalen Pfeil gekennzeichnet, die näher charakterisiert werden sollten (Kap. 5.5).

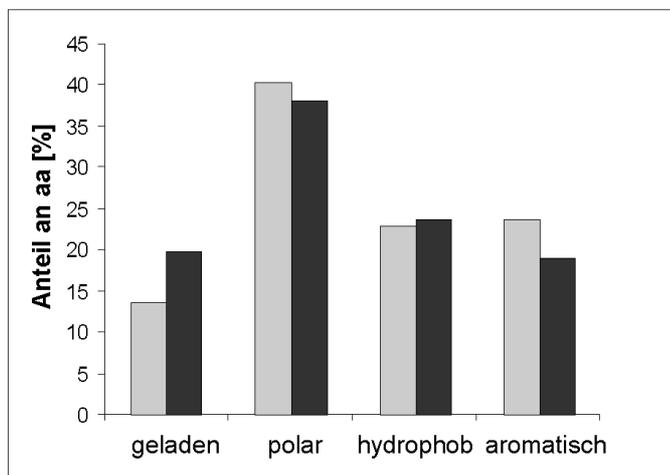
In keiner der Selektionen wurde ein eindeutiges Konsensusmotiv gefunden. In keiner der Sequenzen konnte die Wildtypsequenz gefunden werden und es ist auch keine Präferenz für basische Aminosäuren zu erkennen. Weiterhin zeigt sich, dass unter diesen Selektionsbedingungen Cysteine nicht deutlicher angereichert werden, als andere Aminosäuren. Die Gesamtheit aller vorkommenden Aminosäuren in jeder Selektion wurde nach ihren chemischen Eigenschaften (Tabelle 5-6) eingeteilt und nach ihrem Vorkommen untersucht.

Tabelle 5-6: Einteilung der Aminosäuren nach ihren chemischen Eigenschaften. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt.

chem. Eigenschaft	geladen	polar	hydrophob	aromatisch
Aminosäure	D, E, K, R	G, S, T, N, Q, C	A, I, L, M, P, V	F, W, Y, H

Es wurden nun die Selektionen der jeweiligen pAK-*tat*-Bibliotheken in Abwesenheit und in Anwesenheit von Cyclin T miteinander verglichen. Dabei sollte vor allem auf die Präferenz für eine bestimmte Aminosäuregruppe geachtet werden.

A) pAK-*tat*-RKKR-random-Bibliothek



B) pAK-*tat*-wt-RRRR-random-Bibliothek

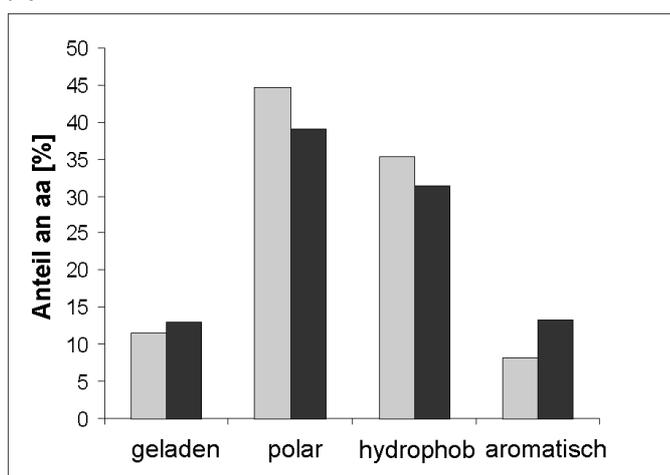


Abbildung 5-18: Anreicherung von Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften. Es wurden jeweils die Selektionen in Abwesenheit (grau) und in Anwesenheit (schwarz) von Cyclin T miteinander verglichen.

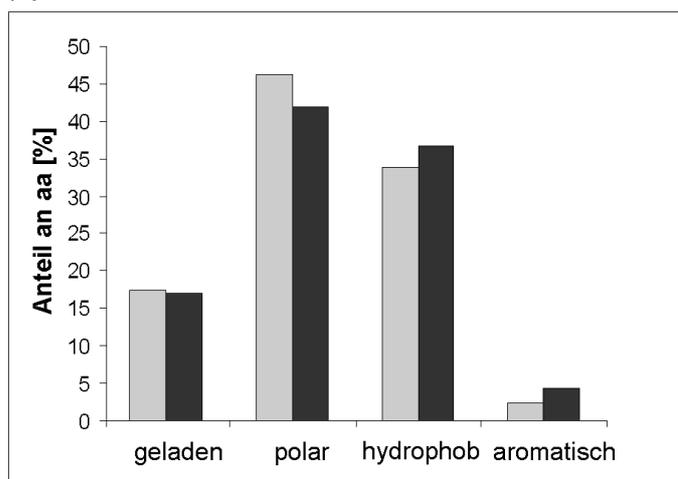
C) pAK-*tat*-C31S-RRRR-random-Bibliothek

Abbildung 5-19: Anreicherung von Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften. Es wurden jeweils die Selektionen in Abwesenheit (grau) und in Anwesenheit (schwarz) von Cyclin T miteinander verglichen.

Cyclin T hat scheinbar keinen Einfluss auf die Verteilung der Aminosäuren. Unabhängig von der Anwesenheit des Kofaktors treten vermehrt polare Reste auf. Aromatische Aminosäuren kommen in den Selektionen der pAK-*tat*-RRRR-random-Bibliotheken nur in sehr geringem Maße vor. Bei den pAK-*tat*-RKKR-random-Bibliotheken treten diese Reste hingegen häufiger auf.

Um zu untersuchen, ob die selektierten Tat-Varianten auch tatsächlich an die TAR-RNA binden, wurden einige Klone ausgewählt und mit diesen Klonen sollten *in vivo*- und *in vitro*-Aktivitätstests durchgeführt. Die entsprechenden Klone sind in Abbildung 5-16 und Abbildung 5-17 mit einem Pfeil gekennzeichnet.

5.5 Charakterisierung der resultierenden HIV-Tat Varianten

5.5.1 Konstruktion von HIV-1-Tat Expressionsplasmiden

Die ausgewählten Tat-Varianten sollten nun in weiteren Experimenten näher untersucht werden. Es sollte die *in vitro* Bindungsaktivität an HIV-TAR-RNA untersucht werden, die *in vivo* Transaktivierungsaktivität, und durch Fusion mit dem grünen Fluoreszenz-Protein sollte die Lokalisation in der Zelle überprüft werden. Dazu mussten die Tat-Varianten aus dem pAK-Vektor in Expressionsplasmide umkloniert werden, die die Expression in *E.coli*, in eukaryoten Zellen und als GFP-Fusion ermöglichten. Um die Klonierung zu vereinfachen wurden daher zuerst die entsprechenden Expressionsvektoren mit den *Sfi*I-Schnittstellen des pAK200-Vektors versehen. Zunächst wurde der Vektor pcDNA-*tat*-mt8bas-GFP(*Sfi*I/*Sfi*I) mit Hilfe eines pcDNA3.1-CT-GFP/TOPO-cloning Kits (Kap. 3.6) konstruiert. Dazu wurde

zunächst das *tat*-Gen aus pAK-*tat*-mt8bas mit den Primern HIV-*tat*-SfiI-TA-N(+) und HIV-*tat*-SfiI-TA-C(-) in einer PCR (Kap. 4.14.1) amplifiziert. Das PCR-Amplifikat wurde gereinigt (Kap. 4.16.2) und mit dem TOPO-Vektor pcDNA3.1-CT-GFP(TOPO) ligiert. Der ligierte Vektor wurde genutzt, um DH5 α -Zellen zu transformieren (Kap. 4.18.1). Positive Transformanten zeigten in einer Kolonie-PCR (Kap. 4.14.2) mit den Primern HIV-*tat*-SfiI-TA-N(+) und GFP-Rev(-) Fragmente von 405 bp Länge. Durch die Verwendung dieser Primerkombination wurde gleichzeitig auf die richtige Orientierung des *tat*-Gens hin selektiert. Die korrekte Nukleotidabfolge des Gens wurde durch Sequenzierung mit T7-Prom(+) nachgewiesen (Kap. 4.17). Der resultierende Vektor ist in Abbildung 5-20 dargestellt.

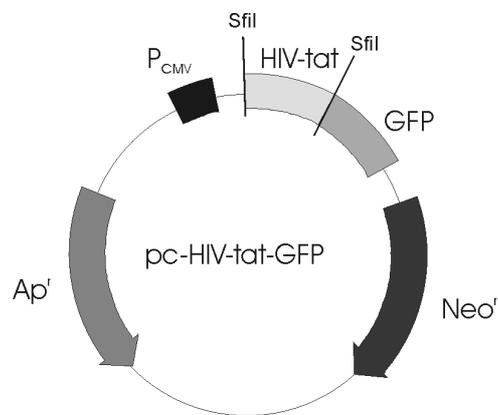


Abbildung 5-20: Der Vektor pcDNA-*tat*-mt8bas-GFP(*SfiI/SfiI*). In die MCS (multiple cloning site) wurde das *tat*-mt8bas-Gen mit flankierenden *SfiI*-Schnittstellen inseriert. Am C-Terminus ist das Gen mit dem grünen Fluoreszenzprotein (GFP) fusioniert.

Ausgehend vom Vektor pcDNA-*tat*-mt8bas-GFP(*SfiI/SfiI*) wurden nun die Vektoren pGEX-*tat*-mt8bas(*SfiI/SfiI*) und pcDNA-*tat*-mt8bas(*SfiI/SfiI*) konstruiert. Dazu wurde HIV-*tat*-mt8bas unter Verwendung der Primer HIV-*tat*-BamHI-SfiI(+) und HIV-*tat*-NotI-SfiI(-) um die Schnittstellen *Bam*HI und *Not*I erweitert (Kap. 4.14.1). Als Ausgangs-DNA diente pcDNA-*tat*-mt8bas-GFP(*SfiI/SfiI*). Das PCR-Amplifikat wurde gereinigt (Kap. 4.10.2), mit *Bam*HI und *Not*I restrigiert und anschließend wurde das Tat-Fragment mit entsprechend restrigiertem pGEX-6P-1 bzw. mit pcDNA3 (Kap. Tabelle 3-2) ligiert. Positive Transformanten ergaben in einer Kolonie-PCR (Kap. 4.14.2) mit den Primern HIV-*tat*-SfiI-TA-N(+) und HIV-*tat*-SfiI-TA-C(-) ein Amplifikat von 235 bp Länge. Auch hier wurde die korrekte Nukleotidabfolge durch Sequenzierung mit den Primern pGEX(+) (für pGEX-*tat*-mt8bas), bzw. mit SP6(+) (für pcDNA-*tat*-mt8bas) überprüft (Kap. 4.17). Die resultierenden Vektoren sind in Abbildung 5-21 dargestellt.

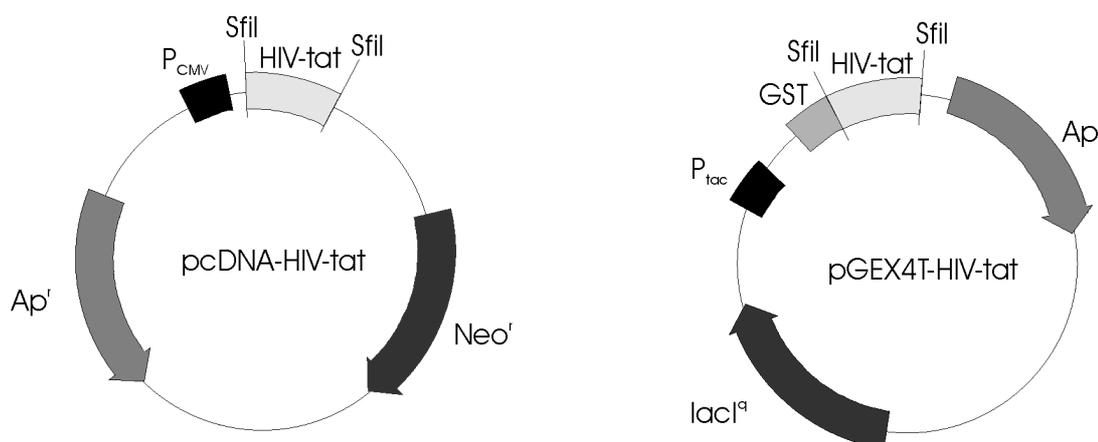


Abbildung 5-21: Die Vektoren pGEX-*tat*-mt8bas(*Sfi*I/*Sfi*I) und pcDNA-*tat*-mt8bas(*Sfi*I/*Sfi*I). In die Vektoren pcDNA3 und pGEX-6P-1 wurde das *tat*-mt8bas-Gen mit flankierenden *Sfi*I-Schnittstellen inseriert.

Es wurden somit drei Expressionsplasmide so modifiziert, dass die selektierten Tat-Varianten über die *Sfi*I-Schnittstellen aus pAK200 umkloniert werden konnten. Für die Konstruktion der weiteren Varianten wurde die pAK-*tat*-DNA der gewünschten Variante mit *Sfi*I hydrolysiert (Kap. 4.12.1), die Fragmente über ein 2 %iges Agarosegel gereinigt (Kap. 4.16.1) und mit einem ebenso hydrolysierten und dephosphoryliertem (Kap. 4.12.3) Vektor (pGEX-*tat*-mt8bas(*Sfi*I/*Sfi*I), DNA-*tat*-mt8bas(*Sfi*I/*Sfi*I) und pcDNA-*tat*-mt8bas-GFP(*Sfi*I/*Sfi*I)) kloniert (Kap. 4.12.4, Kap. 4.18.2). Auch hier wurde der Erfolg der Klonierung mit einer Kolonie-PCR (Kap. 4.14.2) mit den Primern HIV-*tat*-*Sfi*I-TA-N(+) und HIV-*tat*-*Sfi*I-TA-C(-) überprüft, wobei im positiven Fall ein Amplifikat von 235 bp Länge erhalten wurde.

Konstruktion der Varianten pAK-*tat*-GDQF und pAK-*tat*-PMQD

Für die selektierten Tat-Varianten pAK-*tat*-GDQF und pAK-*tat*-PMQD ergab sich das Problem, dass das erhaltene Glutamin durch das Triplet TAG codiert wurde. Dieses ist eigentlich ein Stop-Codon, wird aber im zur Selektion verwendeten Bakterienstamm *E. coli* XL1 Blue mit einer entsprechenden Glutanyl-tRNA supprimiert, so dass ein Glutamin eingebaut wird. Für die Verwendung in einem anderen Bakterienstämmen musste das TAG durch einen Nukleotidaustausch mit Hilfe einer 2-Schritt-PCR (Kap. 4.14.3) in ein CAG umgewandelt werden, welches ein reguläres Glutamin-Codon ist. Unter Verwendung von pAK-*tat*-GDQF(*) bzw. pAK-*tat*-PMQD(*) als Matrize wurde in einer ersten PCR-Amplifikation das HIV-*tat*-Segment zwischen den zu HIV-*tat*-GDQF(+), bzw. HIV-*tat*-PMQD(+) (Mutageneseprimer) und PAKseq-gp3(-) komplementären Sequenzen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gereinigt (Kap. 4.16.1) und anschließend in einer zweiten PCR mit PAKseq-pelB(+) und pAK-*tat*-GDQF(*) bzw. pAK-*tat*-PMQD(*) als Ausgangs-DNA eingesetzt. Das DNA-Fragment mit einer Länge von 345 bp wurde aus einem Agarosegel

gereinigt (Kap. 4.16.1), mit *Sfi*I hydrolysiert (Kap. 4.12.1) und in einen *Sfi*I hydrolysierten pAK-*tat*-wt(E/E) kloniert (Kap. 4.12.4, Kap. 4.18.2). Der Ablauf einer solchen Mutagenese ist in Abbildung 5-22 dargestellt.

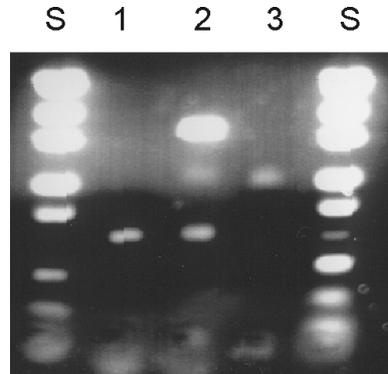


Abbildung 5-22: Ablauf einer 2-Schritt-PCR-Mutagenese (Kap. 4.14.3) von pAK-*tat*-GDQF(*) zu pAK-*tat*-GDQF. Auf einem 2 %igen Agarosegel (Kap. 4.8.1) wurde das Produkt der ersten PCR mit HIV-*tat*-GDQF(+) und PAKseq-gp3(-) als Primer (1), das Amplifikat der zweiten PCR mit PAKseq-pelB(+) und dem Produkt der ersten PCR als Primer vor (2) und nach der Hydrolyse mit *Sfi*I (3) aufgetragen. Als Längenstandard wurde pUC19/*Msp*I-DNA (S) eingesetzt.

Nach Überprüfung der Nukleotidsequenz durch Sequenzierung (Kap. 4.17) wurden die so gewonnenen Vektoren pAK-*tat*-GDQF bzw. pAK-*tat*-PMQD als Ausgangsvektoren für die Klonierung in die Expressionsvektoren pGEX-*tat*-mt8bas(*Sfi*I/*Sfi*I), DNA-*tat*-mt8bas(*Sfi*I/*Sfi*I) und pcDNA-*tat*-mt8bas-GFP(*Sfi*I/*Sfi*I) verwendet.

Konstruktion von pAK-*tat*-mtRKKR

Als Negativkontrolle zu den Varianten der pAK-*tat*-RKKR-random-Bibliothek wurde mittels einer Kassettenmutagenese (Kap. 4.15) eine Mutante konstruiert, in der R49, K50, K51 und R52 durch Alanine ersetzt wurden. Für die Mutagenese wurde pAK-*tat*-wt(E/E) mit *Eco*O109I restrigiert und mit einem 500-fachen Überschuss einer Oligonukleotidkassette aus den annealten Oligonukleotiden pAKmtRKKR5(+) und pAKmtRKKR3(-) ligiert (Kap. 4.12.4). Positive Klone zeigten in einer Kolonie-PCR (Kap. 4.14.2) mit den Primern PAKseq-pelB(+) und PAKseq-gp3(-) ein 345 bp langes Fragment. Auch hier wurde die korrekte Nukleotidsequenz durch Sequenzierung (Kap. 4.17) überprüft.

Insgesamt wurden alle in Tabelle 5-7 dargestellten Tat-Varianten in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-6P-1, in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1-CT-GFP umkloniert und wurden so für die weitere Charakterisierung eingesetzt.

Tabelle 5-7: Tat-Varianten, die für eine weitere Charakterisierung in verschiedene Expressionsplasmide umklontiert wurden.

Tat-Varianten aus den RKKR-random-Bibliotheken	Tat-Varianten aus den RRRR-random-Bibliotheken	weitere Tat-Varianten
Tat-wt-VPGW	Tat-wt-EQLSG	Tat-wt
Tat-wt-RIVK	Tat-wt-SQRL	Tat-wt-mtRKKR
Tat-wt-GDQF	Tat-wt-CQLSL	Tat-wt-mtRRRR
Tat-wt-PMQD	Tat-wt-GQCIR	Tat-wt-mt8bas
	Tat-wt-LQPLR	
	Tat-C31S-GQGGC	
	Tat-C31S-EQLSG	

5.5.2 *In vitro* Aktivitätstest

Für einen *in vitro* Aktivitätstest wurden alle in Tabelle 5-7 aufgeführten HIV-Tat-Varianten als GST-Fusion überexprimiert und das gereinigte GST-HIV-Tat-Fusionsprotein wurde auf die Bindung an HIV-TAR in Gelretardationsexperimenten hin untersucht.

5.5.2.1 Reinigung von GST-HIV-Tat-Varianten

Da für die Gelretardationsexperimente nur geringe Mengen an GST-Tat benötigt wurden, wurde die Reinigung in einem kleinen Maßstab durchgeführt. Die pGEX-Tat-Plasmide mit der jeweiligen in Tabelle 5-7 aufgeführten Tat-Variante wurden in den Expressionsstamm *E.coli* BL21 RIL transformiert (Kap. 4.18.1). Jeweils ein Volumen von 20 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) wurde mit *E.coli* BL21 RIL/pGEX-Tat auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,7 und 0,8 wurde der *tac*-Promotor des pGEX-Plasmids mit 1 mM IPTG induziert und 3 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet (Kap. 4.1). Aus dem Zellextrakt wurde in einem Chromatographie-Schritt an einer Glutathion-Sepharose das GST-HIV-Tat-Fusionsprotein gereinigt (Kap. 4.20.2). Auf eine Abspaltung des GST-Anhangs konnte verzichtet werden, da bekannt ist, dass dieser bei Gelretardationsexperimenten mit HIV-TAR keine verfälschende Auswirkung hat (Wei et al., 1998). Die Cysteine der cysteinreichen Sequenzdomäne von HIV-Tat sind für die Bindung an Cyclin T1 notwendig. Man vermutet, dass diese Bindung über Zn²⁺-Ionen vermittelt wird und für diese Vermittlung müssen die Cysteine in reduzierter Form vorliegen. Daher wurde die gesamte Reinigung unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Durchführung der

einzelnen Reinigungsschritte ist am Beispiel von GST-Tat-wt in Abbildung 5-23 dokumentiert.

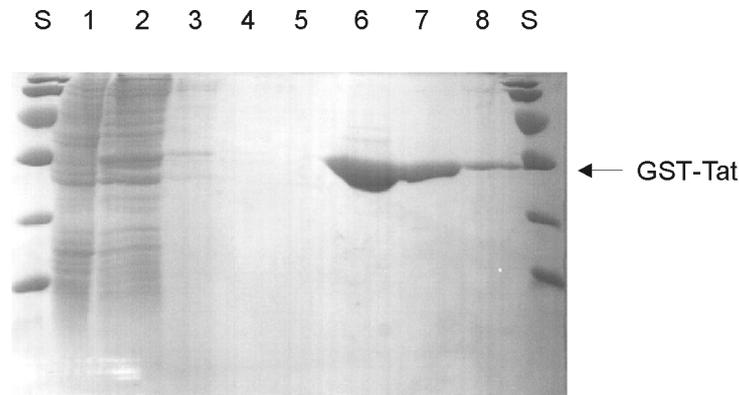


Abbildung 5-23: Reinigung von GST-Tat-wt-Fusionsprotein. Die Analyse erfolgte auf einem 15 %igen SDS-PAGE (Kap. 4.8.4). Aufgetragen wurde (S) Pharmacia „Low Range“ Standard, 5 μ l, (1) Zellrohextrakt, 5 μ l, (2) Säulendurchlauf, 10 μ l, (3)-(5) Waschfraktionen 1-3, je 20 μ l, (6)-(8) Eluate 1-3, je 20 μ l.

Anhand von Abbildung 5-23 erkennt man, dass es nur zu einer geringen Expression von GST-Tat kam. Dieser Effekt war bei der Reinigung aller Tat-Varianten zu beobachten. Dennoch konnte für die folgenden Experimente genügend GST-Tat-Fusionsprotein gereinigt werden und alle Tat-Varianten wurden so in einem Reinheitsgrad von mindestens 95 % präpariert. Jeweils die ersten beiden, GST-Tat enthaltende Eluate wurden vereinigt, mit Glycerin (Endkonzentration 50 %) versetzt und bei -20°C gelagert.

5.5.2.2 Gelretardationsexperimente mit GST-Tat

Mit Hilfe von RNA-Bindungsexperimenten unter Verwendung nativer PAGE kann die Bindung von RNA-bindenden Proteinen untersucht werden. Als Ziel-RNA wurde das Minimalelement der HIV-TAR (Kap. 3.6) verwendet. Diese wurde am 5'-Ende unter Verwendung von T4-Polynukleotidkinase (Kap. 4.12.2) mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ markiert. Die Bindungsreaktion wurde wie in Kap. 4.22 durchgeführt. Zunächst wurden binäre Experimente durchgeführt, d.h. es wurde nur die Bindung der verschiedenen GST-Tat-Varianten an HIV-TAR-RNA untersucht. Die Bildung eines Tat-TAR-Komplexes wurde durch ein natives PAGE nachgewiesen (Kap. 4.8.3).

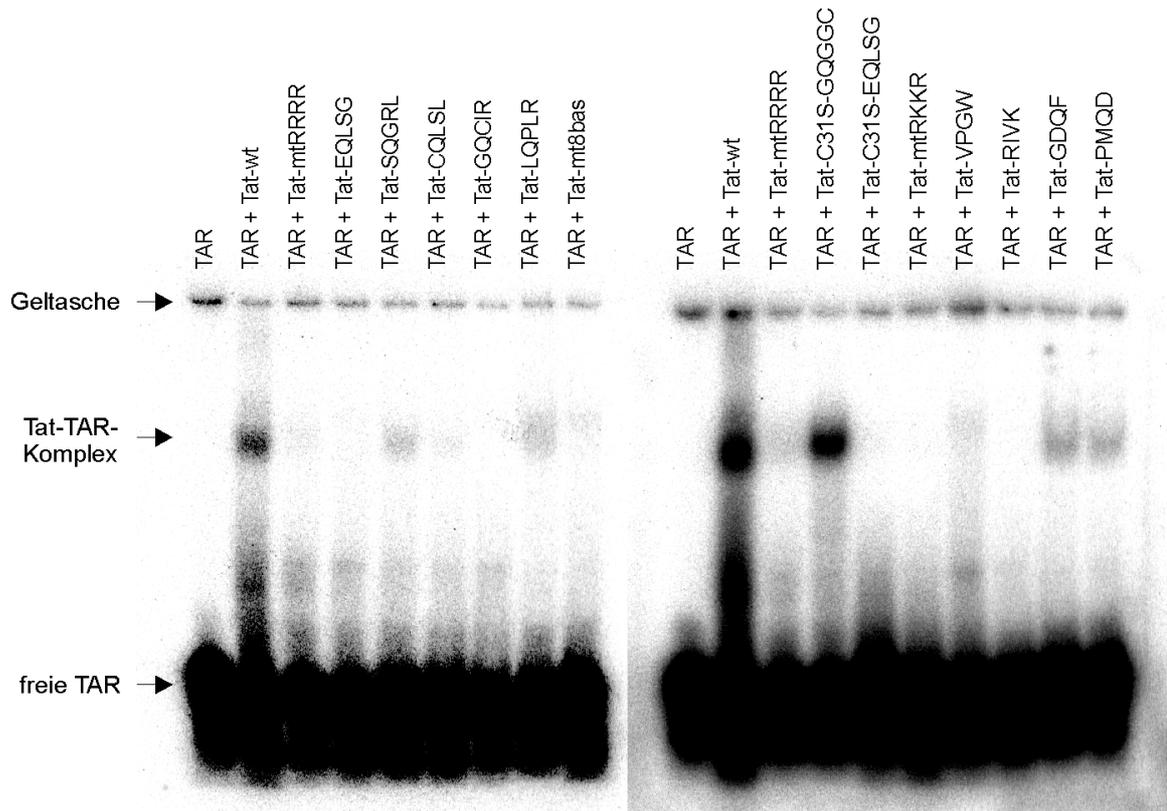


Abbildung 5-24: Gelretardationsexperimente an HIV-TAR. Gezeigt ist die Bindung von HIV-Tat-Varianten an HIV-TAR-RNA. Die TAR-RNA wurde in einer Konzentration von $0,025 \mu\text{M}$ eingesetzt, Kompetitor-RNA (tRNA aus Hefe) und GST-Tat wurden in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ verwendet. Die erfolgte Bindung wurde durch ein 4 %iges natives PAGE (Kap. 4.8.3) nachgewiesen.

Die selektierten Tat-Varianten zeigten im binären System sehr verschiedene Bindungseigenschaften. Die Varianten Tat-wt, Tat-C31S-GQGGC, Tat-GDQF, Tat-PMQD und Tat-LQPLR binden im binären System an die TAR-RNA, während sich keine Bindung für Tat-mtRKKR, Tat-mtRRRR, Tat-EQLSG, Tat-C31S-EQLSG und Tat-RIVK an TAR-RNA zeigt. Interessant ist dabei, dass die Varianten Tat-EQLSG, Tat-C31S-EQLSG und Tat-RIVK aus den Selektionen in Anwesenheit von Cyclin T stammen, d.h. sie benötigen wohl den Kofaktor für die Bindung.

In einem weiteren Experiment wurde nun die Bindung der verschiedenen Tat-Varianten in Gegenwart von Cyclin T an die TAR-RNA untersucht. Dafür wurde reines Cyclin T (aa 1-272) eingesetzt (Kap. 3.5). Das Experiment wurde wie in Kap. 4.8.3 beschrieben durchgeführt. In Vorversuchen wurde zunächst die Spezifität der Tat-TAR-Bindung und die Cyclin T1-TAR-Bindung untersucht. Dazu wurden Bindungsexperimente in Gegenwart steigender Konzentrationen an unspezifischer tRNA aus Hefe durchgeführt (Abbildung 5-25). Sowohl die Bindung von HIV-Tat, als auch die Bindung von Cyclin T1 an TAR-RNA wird durch die Anwesenheit eines 20-fachen Überschusses an unspezifischer tRNA vermindert und mit einem 40-fachen Überschuss an unspezifischer tRNA ganz unterdrückt.

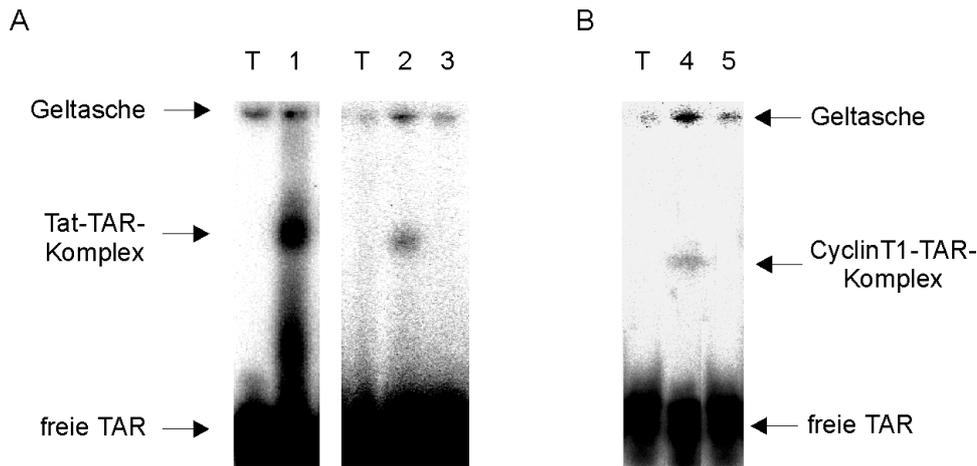


Abbildung 5-25: Gelretardationsexperiment an HIV-TAR. Gezeigt ist die Bindung von GST-Tat-wt an HIV-TAR-RNA (A) und die Bindung von Cyclin T1 an HIV-TAR-RNA (B). Die TAR-RNA wurde in einer Konzentration von $0,025 \mu\text{M}$ eingesetzt, GST-Tat und Cyclin T1 wurde in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ verwendet. Das Gel wurde wie folgt beladen: (T) TAR; (1) TAR, GST-Tat; (2) TAR, GST-Tat, unspezifische tRNA ($0,5 \mu\text{M}$); (3) TAR, GST-Tat unspezifische tRNA ($1 \mu\text{M}$); (4) TAR, Cyclin T1, tRNA ($0,5 \mu\text{M}$); (5) TAR, Cyclin T1, tRNA ($1 \mu\text{M}$). Die erfolgte Bindung wurde durch ein 4 %iges natives PAGE (Kap. 4.8.3) nachgewiesen.

Um die Bildung eines binären Cyclin T1-TAR-Komplexes zu unterdrücken wurden daher die nachfolgenden Experimente in Gegenwart eines 40-fachen Überschusses an tRNA durchgeführt.

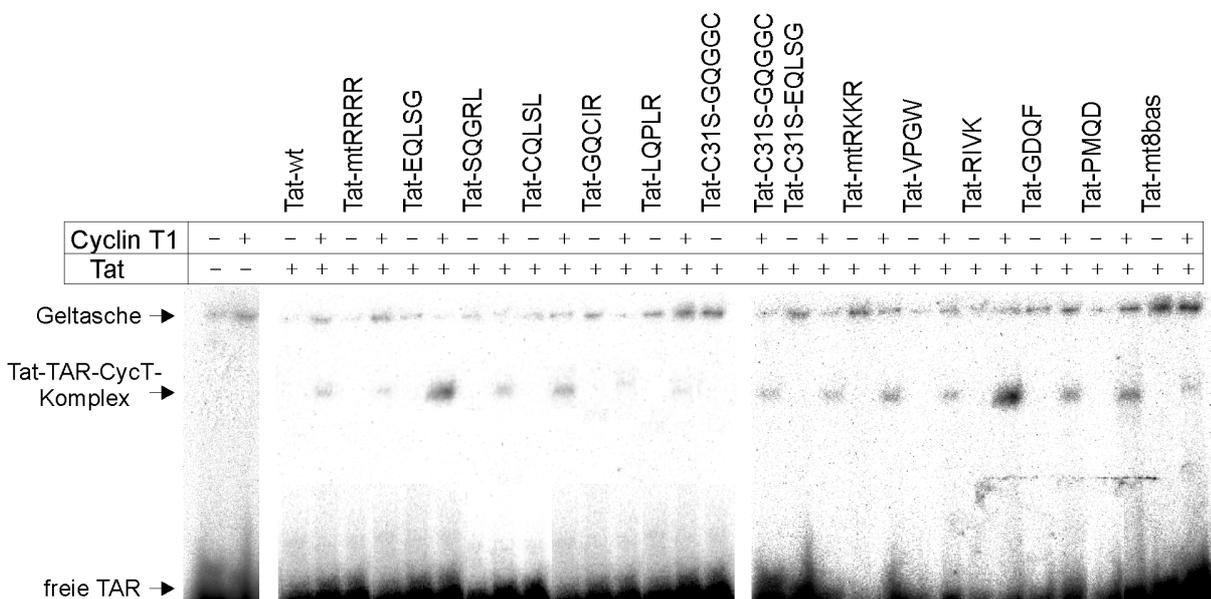


Abbildung 5-26: Gelretardationsexperimente an HIV-TAR. Gezeigt ist die Bindung von HIV-Tat-Varianten an HIV-TAR-RNA in Gegenwart von Cyclin T. Die TAR-RNA wurde in einer Konzentration von $0,025 \mu\text{M}$ eingesetzt, als Kompetitor diente unspezifische tRNA in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$, GST-Tat und Cyclin T wurde in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ verwendet. Die erfolgte Bindung wurde durch ein 4 %iges natives PAGE (Kap. 4.8.3) nachgewiesen.

In Gegenwart von Cyclin T waren alle Tat-Varianten in der Lage an HIV-TAR zu binden. Durch die Zugabe eines 40fachen Überschusses an Kompetitor-tRNA aus Hefe wurde die

unspezifische Bindung von Cyclin T an die TAR-RNA unterbunden. Dadurch wurde auch die Bindung von GST-Tat an TAR-RNA unterdrückt. (Abbildung 5-26).

5.5.3 *In vivo* Aktivitätstest

Die selektierten Tat-Varianten sollten nun auch auf ihre *in vivo* Aktivität hin untersucht werden. Zum einen war die Frage von Interesse, ob die verschiedenen Tat-Varianten noch in der Lage waren das HIV-LTR zu transaktivieren. Dies sollte in einem Dualen Luciferase Assay untersucht werden. Die basische Sequenzdomäne von HIV-Tat dient neben der RNA-Bindungs-Funktion noch als Kernlokalisationssequenz (Kuppuswamy et al., 1989). Daher war es von Interesse, ob die Tat-Varianten, in denen ein Teil dieser Kernlokalisationssequenz mutiert ist, noch in der Lage sind, diese Funktion zu erfüllen.

5.5.3.1 Transaktivierung des HIV-LTR durch verschiedene Tat-Varianten

Für die Untersuchung der Transaktivierungsfähigkeit verschiedener Tat-Varianten wurden die *tat*-tragenden pcDNA-Plasmide präpariert (Kap. 4.11.1) und zusammen mit den Reporterplasmiden pGL-HIV-LTR und pRL-TK wurden damit 293-Zellen transfiziert (Kap. 4.18.3). 293-Zellen sind menschliche Zellen (Graham et al., 1977), die das humane Cyclin T1 exprimieren. In Vorversuchen wurden auch HeLa-Zellen verwendet. Sie konnten allerdings nicht für die Experimente genutzt werden, da dort die basale Transkriptionsrate durch zelluläre Faktoren sehr hoch ist. Das Prinzip des Assays ist in Abbildung 5-27 gezeigt. Wenn die transfizierte Tat-Variante aktiv bezüglich der Transaktivierung des HIV-LTR ist, so wird die nachgeschaltete Firefly-Luciferase exprimiert. Das Plasmid pRL-TK kodiert für die Renilla Luciferase, die unter der Kontrolle eines schwachen, konstitutiven Promotor steht. Es dient als interner Standard, so dass die Auswertung unabhängig von der transfizierten Zellzahl steht. In einem Kontrollexperiment werden nur die beiden Reporterplasmide transfiziert und das Verhältnis der beiden Luciferasen zueinander gibt den zellulären Hintergrund der Transaktivierung des HIV-LTR an.

Kotransfektion der
Plasmide in
293-Zellen

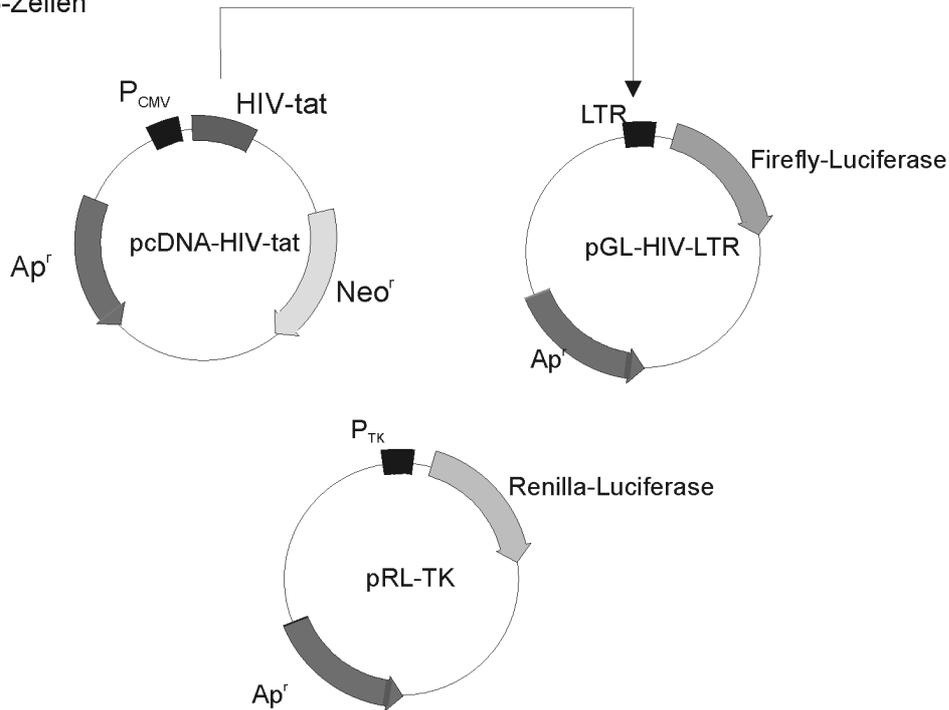


Abbildung 5-27: Prinzip des dualen Luciferase Assays. Das Tat-tragende pcDNA-Plasmid wird zusammen mit den Reporterplasmiden pGL-HIV-LTR und pRL-TK transfiziert. Ein funktionelles Tat-Protein aktiviert das HIV-LTR und es kann Firefly-Luciferase exprimiert werden. Als interner Standard dient die Aktivität der Renilla-Luciferase.

Zur Bestimmung der Aktivität der Luciferasen wurden 48 h nach der Transfektion die Zellen geerntet und durch eine passive Lyse wurde ein Zellysat gewonnen. Jeweils 20 µl des Lysats wurden in den dualen Luciferase Assay eingesetzt. Bei diesem Assay wurde zunächst die Aktivität der Firefly-Luciferase gemessen. Durch Zugabe der zweiten Substrat-Lösung wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase unterdrückt und gleichzeitig das Substrat für die Renilla-Luciferase zugegeben und daraufhin die Aktivität der Renilla-Luciferase bestimmt (Kap. 4.21). Die resultierende Transaktivierungsaktivität wurde auf den Hintergrund durch das HIV-LTR normiert.

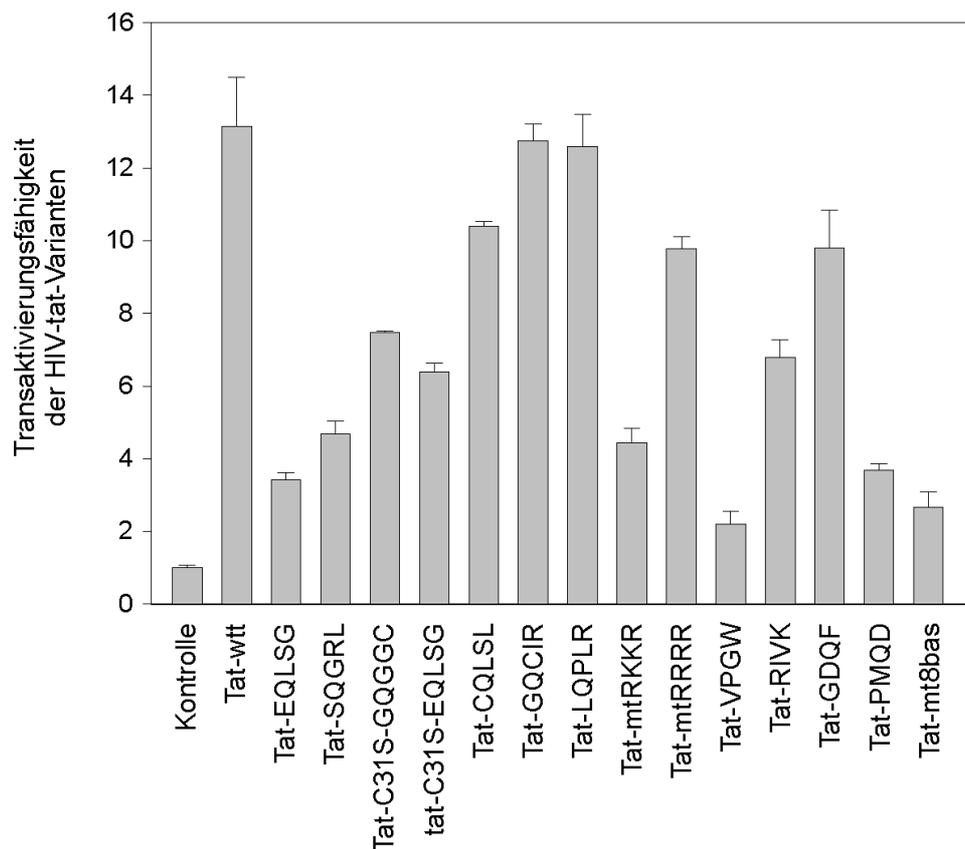


Abbildung 5-28: Transaktivierungsaktivität verschiedener Tat-Varianten im Dualen Luciferase Assay. Jeweils 5×10^5 293-Zellen wurden mit $2 \mu\text{g}$ pcDNA-*tat*-Plasmid und mit je 50 ng der beiden Reporterplasmide pGL-HIV-LTR und pRL-TK transfiziert. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt und die Aktivität der Luciferasen im Zellysate wurde jeweils doppelt bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aller Ergebnisse mit der Standardabweichung. Die Kontrolle stellt den zellulären Hintergrund dar, der nach der Transfektion der beiden Reporterplasmide bestimmt wurde. Auf diesen Wert wurden alle anderen Aktivitäten normiert.

Alle untersuchten Tat-Varianten zeigen eine *in vivo* Aktivität. Für Tat-wt wurde eine Transaktivierung von 13 ermittelt, während für Tat-VPGW die geringste Transaktivierung mit einem Wert von 2,2 beobachtet wurde. Ebenfalls nur eine geringe Aktivität wurde für Tat-mt8bas beobachtet. Das Ausmaß der Aktivität ist unabhängig davon, ob Varianten der pAK-*tat*-RRRR-random-Bibliothek oder der pAK-*tat*-RKKR-random-Bibliothek untersucht wurden.

5.5.3.2 Lokalisation der Tat-Varianten in der Zelle

Um zu überprüfen, ob die Tat-Varianten noch in der Lage waren, die Lokalisation des Proteins im Zellkern zu gewährleisten, wurden die Tat-Varianten am C-Terminus mit einer GFP-Fusion versehen (Kap. 5.5.1). Mit den resultierenden Plasmiden wurden 3T3-Zellen mit den verschiedenen pcDNA-*tat*-GFP-Plasmiden transfiziert (Kap. 4.18.3). Bei den 3T3-Zellen handelt es sich um Nagerzellen (Todaro et al., 1965), die für die *in vivo* Aktivitätstests nicht

verwendet werden konnten, da das Nager-Cyclin T1 nicht funktionell bezüglich der HIV-Tat-TAR-Bindung ist. Für der Lokalisationsstudien konnten sie allerdings eingesetzt werden, da hierfür das Cyclin T1 nicht notwendig war und die 3T3-Zellen im Gegensatz zu den 293-Zellen einen größeren Zellkörper im Vergleich zum Zellkern besitzen. Dadurch konnten die zellulären Strukturen besser unterschieden werden. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit ToPro-3 gefärbt, um den Zellkern sichtbar zu machen (Kap. 4.19). Durch die Expression der Tat-GFP-Fusion konnte die Lokalisation von HIV-Tat in der Zelle beobachtet werden. Anschließend wurden die Präparate mit einem Konfokalmikroskop untersucht. Damit war es möglich genau eine Ebene einer Zelle zu betrachten.

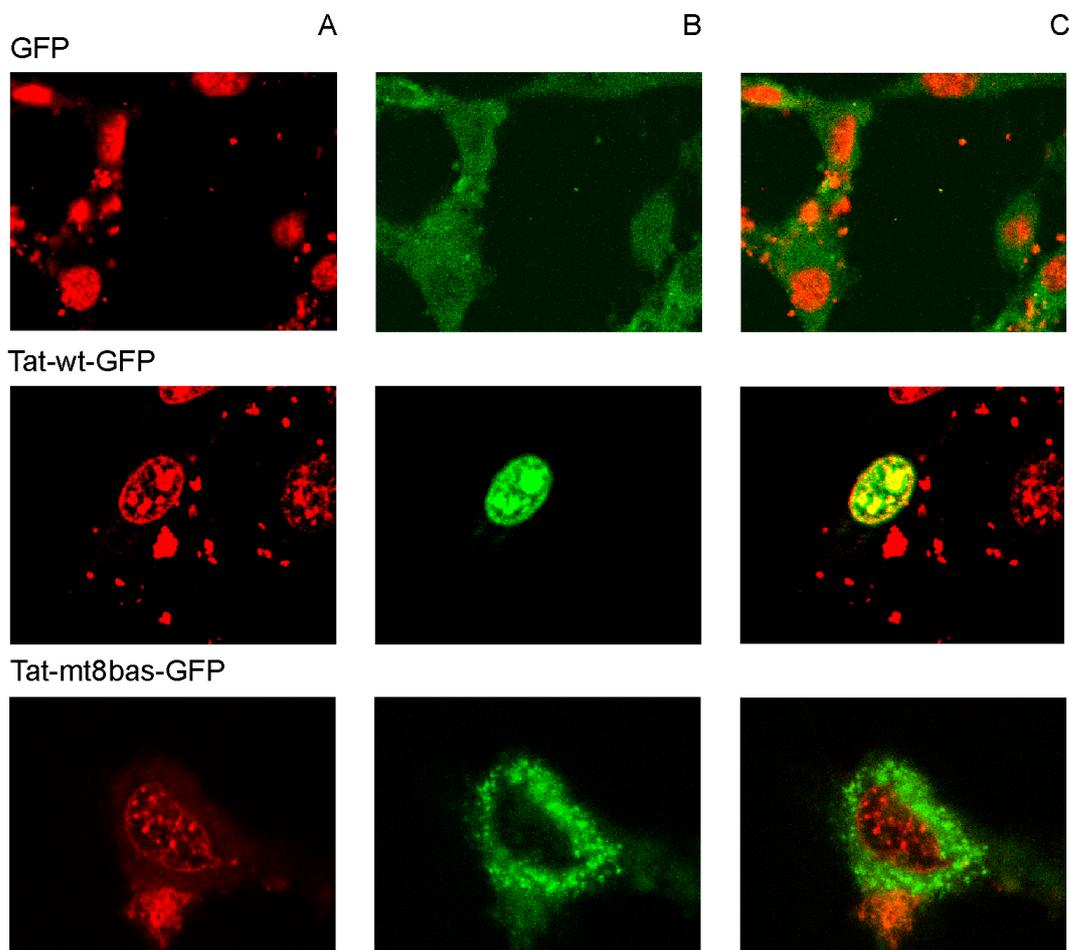


Abbildung 5-29: Lokalisation von Tat-Varianten in der Zelle. Es wurden 1×10^5 Zellen mit jeweils $2 \mu\text{g}$ DNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit ToPro-3 angefärbt. Es ist jeweils die Färbung des Zellkerns (A), die Fluoreszenz durch GFP (B) und die Überlagerung beider Fluoreszenzen (C) gezeigt. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica IRBE Mikroskop unter Verwendung der Software TCSMT aufgenommen.

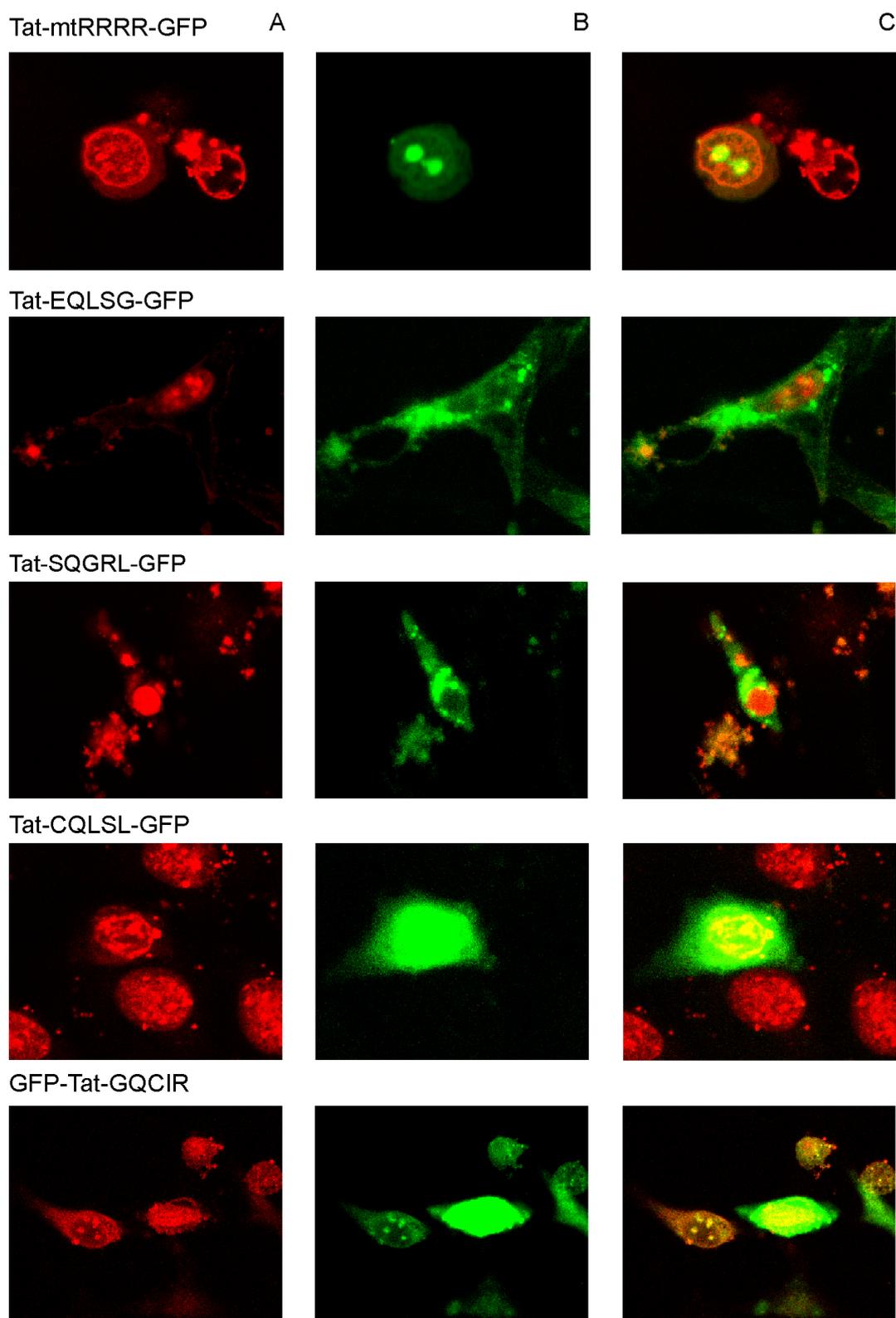


Abbildung 5-30: Lokalisation von Tat-Varianten in der Zelle. Es wurden 1×10^5 Zellen mit jeweils $2 \mu\text{g}$ DNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit ToPro-3 angefärbt. Es ist jeweils die Färbung des Zellkerns (A), die Fluoreszenz durch GFP (B) und die Überlagerung beider Fluoreszenzen (C) gezeigt. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica IRBE Mikroskop unter Verwendung der Software TCSMT aufgenommen.

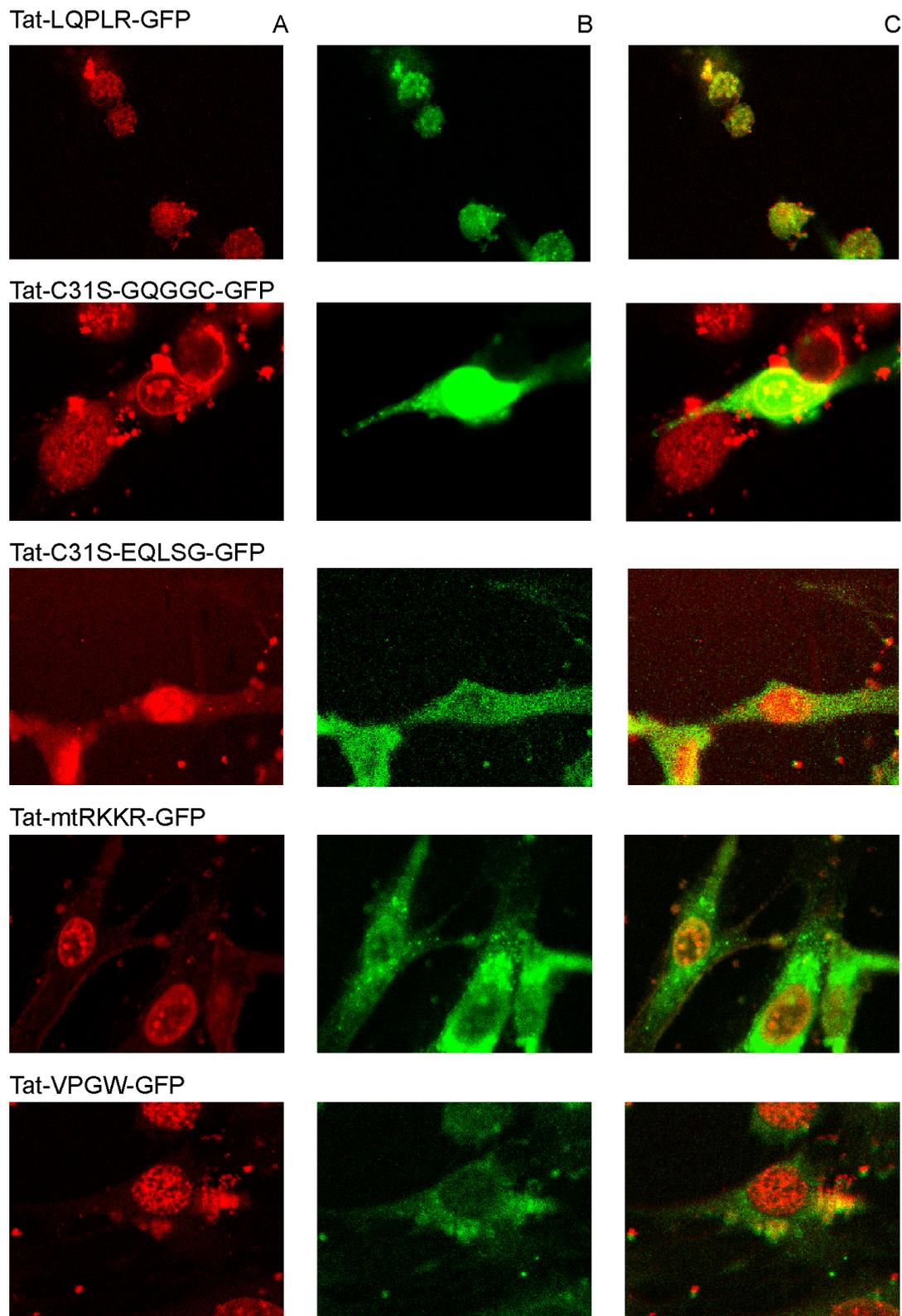


Abbildung 5-31: Lokalisation von Tat-Varianten in der Zelle. Es wurden 1×10^5 Zellen mit jeweils $2 \mu\text{g}$ DNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit ToPro-3 angefärbt. Es ist jeweils die Färbung des Zellkerns (A), die Fluoreszenz durch GFP (B) und die Überlagerung beider Fluoreszenzen (C) gezeigt. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica IRBE Mikroskop unter Verwendung der Software TCSMT aufgenommen.

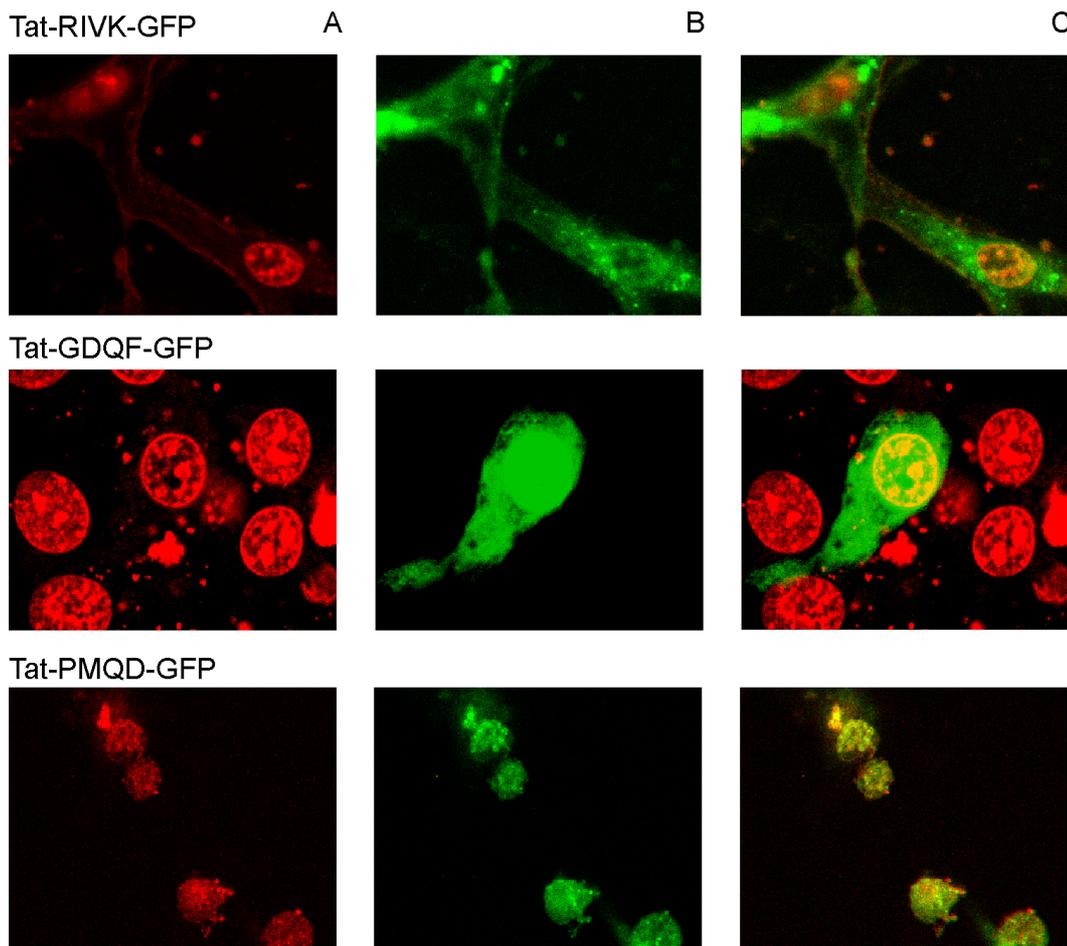


Abbildung 5-32: Lokalisation von Tat-Varianten in der Zelle. Es wurden 1×10^5 Zellen mit jeweils $2 \mu\text{g}$ DNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit ToPro-3 angefärbt. Es ist jeweils die Färbung des Zellkerns (A), die Fluoreszenz durch GFP (B) und die Überlagerung beider Fluoreszenzen (C) gezeigt. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica IRBE Mikroskop unter Verwendung der Software TCSMT aufgenommen.

In Abbildung 5-29 bis 5-32 ist die Lokalisation aller Tat-Varianten in der Zelle gezeigt. Das GFP ohne Fusion verteilt sich in der Zelle gleichmäßig und gelangt auch ohne Kernlokalisationssequenz (NLS) in den Zellkern. Durch die Fusion mit HIV-Tat wird es zu groß, als das es passive Transportwege nutzen könnte, und es gelangt nur aufgrund der NLS von HIV-Tat in den Zellkern. Die Variante Tat-mt8bas besitzt keine funktionelle NLS und lokalisiert nur im Cytoplasma. Die Varianten Tat-VPGW liegt nicht im Kern vor. Alle anderen Tat-Varianten lokalisieren zumindest teilweise im Kern.

5.5.4 Wahl der Strategie für die Modellierung von Tat-Varianten

Eine zuverlässige Aussage über die Affinität einzelner Tat-Mutanten für die TAR mittels theoretischer Methoden, würde die Abschätzung der freien Enthalpie der Bindung (ΔG) erfordern. In der Literatur sind mehrere entsprechende Verfahren wie z.B. "Free Energy Perturbation", "Thermodynamic Integration", "Linear Interaction Energy" oder MM-PBSA beschrieben (Wang et al., 2001).

Zwei der für den (zuverlässigen) Einsatz dieser Verfahren notwendigen Voraussetzungen sind allerdings für das Tat-TAR-System nicht erfüllt: Für den Tat-TAR-Komplex existiert keine experimentell bestimmte hochaufgelöste Komplexstruktur, sondern nur ein Strukturmodell, das auf der Basis von biochemischen Daten und der Struktur eines Tat-TAR-Teilkomplexes erhalten wurde (Seewald et al., 1998). Darüber hinaus erfordern Methoden zur Abschätzung von Bindungsenthalpien eine genaue Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen und somit der Partialladungen einzelner Atome, was insbesondere für Komplexe stark geladener Bindungspartner gegenwärtig noch problematisch ist (Kollman et al., 2000).

Die in dieser Arbeit verwendete Strategie beschränkt sich deshalb auf die Betrachtung sterischer Kriterien zur Charakterisierung der Tat-TAR Wechselwirkung. Wegen der Problematik einer exakten Parametrisierung der elektrostatischen Wechselwirkungen wurden hier nur die van der Waals Wechselwirkungen betrachtet. Letztere ermöglichen eine Aussage darüber, welche der modellierten Komplexe unter sterischen Gesichtspunkten "günstig" erscheinen. Zur Abschätzung, ob einzelne Mutanten uneingeschränkt mit der Topologie des wt-Tat-TAR Komplexes kompatibel sind, oder ob größere strukturelle Umlagerungen erwartet werden, wurde zusätzlich der RMSD-Wert zur Startstruktur ermittelt.

Um die Fehlerquelle, die durch das Fehlen einer experimentell bestimmten Ausgangsstruktur entsteht, möglichst gering zu halten, wurden jeweils die 10 energieärmsten Modellstrukturen als Basis für die Modellierung der Mutanten gewählt. Die erhaltenen Energien und RMSD-Werte sind jeweils Mittelwerte aus 10 unabhängigen Modellierungen für jeden Mutante. Sie sind in Tabelle 5-8 dargestellt.

Parallel dazu wurde aus den gesamten Sequenzen der Selektion der pAK-*tat*-mtRKKR-Bibliothek eine Konsensussequenz errechnet und ausgehend von dieser Sequenz wurde dann wiederum eine „Negativkontrolle“ bestimmt. Damit ergab sich die (theoretische) Mutante Tat G48L, R49D, K50W, K51F, R52C. Auch für diese Tat-Variante wurde ein Modelling durchgeführt und die erhaltenen Energien und der RMSD-Wert ist in der Tabelle aufgeführt (Tat-LDWFC).

Tabelle 5-8: Ergebnisse der Modellierung der Tat-Varianten. Aufgeführt sind die van der Waals-Energien [kcal/mol] vor und nach 50 Schritten der Energieminimierung, sowie die erhaltenen RMSD-Werte mit den jeweils zugehörigen Standardabweichungen. Die Berechnung erfolgte mit einem Triplos Kraftfeld.

Tat-Variante	Van der Waals-Energie		Van der Waals-Energie		RMSD [Å]	
	(vor Energie-Min)		(nach Energie-Min)		(gesamtes Peptid)	
Tat-wt	-472,01	5,383	-478,75	6,175	0,0586	0,0380
Tat-VPGW	3,29 x 10 ⁹	5,05 x 10 ⁹	-421,47	11,640	0,2783	0,0489
Tat-GDQF	3,28 x 10 ⁶	5,88 x 10 ⁶	-452,04	4,558	0,1019	0,0195
Tat-RIVK	-423,15	22,443	-458,55	5,162	0,05	0,0390
Tat-PMQD	1,58 x 10 ⁹	2,55 x 10 ⁹	-447,01	6,749	0,248	0,0360
Tat-mtRKKR	-452,01	9,894	-470,02	5,968	0,1212	0,0308
Tat-EQLSG	-447,11	13,720	-465,96	4,531	0,0529	0,0101
Tat-SQGRL	-450,27	8,208	-464,01	5,536	0,0819	0,1790
Tat-LQPLR	6,30 x 10 ⁸	7,17 x 10 ⁸	-460,65	5,781	0,3129	0,0330
Tat-GQCIR	-457,21	8,963	-468,32	4,824	0,1068	0,173
Tat-CQLSL	-448,47	10,608	-467,45	5,722	0,0477	0,0124
Tat-GQGGC	-452,65	6,215	-459,73	5,309	0,0412	0,0093
Tat-LDWFC	4,27 x 10 ⁹	7,65 x 10 ⁹	-356,96	139,77	0,1056	0,0223

Für alle 13 untersuchten Tat-Mutanten, die aus den Selektionen ausgewählt wurden, werden nach der Energieminimierung Strukturen mit van der Waals Energien in der Größenordnung von 88-98% der Wildtyp-Energie erhalten, so dass hier größere sterische Konflikte ausgeschlossen werden können. Alle der modellierten Peptide weisen für das Phosphatrückgrat einen RMSD von weniger als 0.3 Å zur Startstruktur auf. Die größten Abweichungen werden für Peptide erhalten, in denen sich ein Prolin befindet

Zusammenfassend ergeben sich aus den durchgeführten Modellierungen keine Hinweise darauf, dass die ausgewählten Varianten inkompatibel mit der Modellstruktur des Tat-TAR Komplexes wären.

5.6 Selektion einer Ph.D-12-Phagenbibliothek

Bei der Selektion der pAK-*tat*-Bibliotheken traten nur wenige basische Aminosäurereste auf. Daher stellte sich die Frage, ob dies darauf zurückzuführen ist, dass die basischen Reste den

Transport von HIV-Tat durch die *E.coli* Membran negativ beeinflussen. Diese Vermutung kommt daher, dass im Fall der M13-Hüllproteine die Einführung eines Argininrestes zu einem Verlust der Translokationsfähigkeit durch die Membran führt (Kuhn, 1995). Mit einer Ph.D-12-Phagenbibliothek (Kap. 3.2.2) sollte nun untersucht werden, ob TAR-RNA-bindende Peptide mit gehäuftem Auftreten von basischen Resten selektiert werden können. Das Experiment wurde wie in Kapitel 4.24.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden in verschiedenen Selektionen die Wasch- und Elutionsschritte variiert (Tabelle 5-9). Damit sollte erreicht werden, dass die gefundenen Peptide aufgrund verschiedener Spezifitäten und Affinitäten an TAR-RNA selektioniert wurden. Durch Elution mit freier TAR-RNA konnten ganz spezifisch bindende Peptide gefunden werden, während durch Elution mit Triethylamin (TEA) alle Phagen, die an TAR-RNA binden, eluiert wurden. Durch die Elution mit freier TAR-RNA und nachfolgender Hydrolyse der TAR-RNA sollte eine Erniedrigung des K_{off} für die Dissoziation des Phagen von der RNA erreicht werden.

Tabelle 5-9: Durchführung verschiedener Selektionen einer Ph.D-12-Phagenbibliothek gegen HIV-TAR-RNA. Dargestellt sind die verschiedenen Wasch- und Elutionsschritte. Bei Waschschritten mit tRNA wurde mit 1 mg/ml Gesamt-tRNA aus Hefe in TBS (+ 0,1 % Tween 20) gewaschen.

Selektion	Waschen 1. Runde	Waschen 2. Runde	Waschen 3. Runde	Elution
A	6 x TBS	6 x TBS	6 x TBS	0,1 M TEA
B	1 x tRNA	3 x tRNA	5 x tRNA	100 μ M TAR
C	1 x tRNA	3 x tRNA	5 x tRNA	0,1 M TEA
D	1 x tRNA	5 x tRNA	7 x tRNA	0,1 M TEA
E	1 x tRNA; 2 h mit 50 μ M TAR	3 x tRNA; 6 h mit 50 μ M TAR	5 x tRNA; 24 h mit 50 μ M TAR	0,1 M TEA
Kontrolle	6 x TBS	6 x TBS	6 x TBS	0,1 M TEA

Für das Kontrollexperiment wurde eine Selektion in einem Streptavidin-beschichteten Röhrchen ohne immobilisierte 5'-biotinylierte HIV-TAR durchgeführt. Nach drei Selektionsrunden wurden die erhaltenen Peptide durch Sequenzierung mit dem Primer M13-Seq(-) überprüft. Die Sequenzen sind im Anhang (Tabelle 11-3) dargestellt. Es wurde kein spezielles Bindungsmotiv für HIV-TAR gefunden. Abbildung 5-33 zeigt die Verteilung der einzelnen Aminosäuren in einem 12er Peptid nach drei Runden Selektion unter verschiedenen Bedingungen.

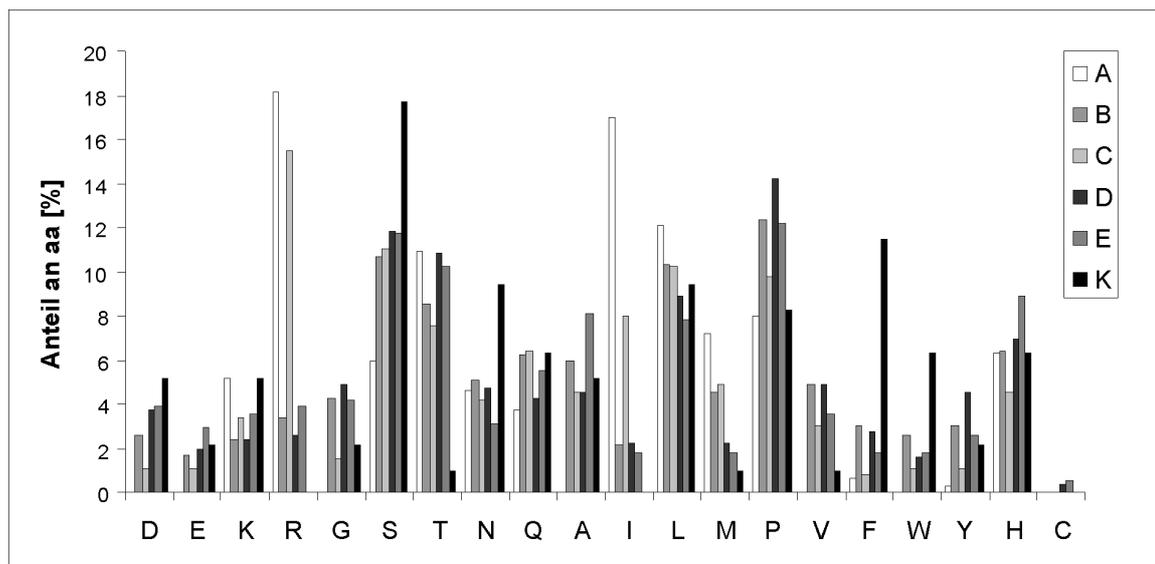


Abbildung 5-33: Verteilung der Aminosäuren in den verschiedenen Selektionen. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode in der prozentualen Verteilung angegeben und nach ihren Eigenschaften geordnet. Die Durchführung der Selektionen A-E und K sind in Tabelle 5-9 dargestellt.

Es zeigt sich, dass in den Peptiden der Selektionen A und C die Anzahl an Argininen und Isoleucinen stark erhöht ist. In allen Peptiden kommen nur sehr wenige Cysteine vor, Tryptophan und Phenylalanin sind nur in geringem Maße vertreten. Um einen besseren Überblick über die Zusammensetzung der Peptide damit zu erhalten, wurden auch hier die Aminosäuren nach ihren chemischen Eigenschaften (Tabelle 5-6) zusammengefasst. Mit dieser Auswertung (Abbildung 5-34) konnte nun die Gesamtheit der Peptide nun nach Präferenzen für bestimmte chemische Eigenschaften unter den selektierten Aminosäuren betrachtet werden.

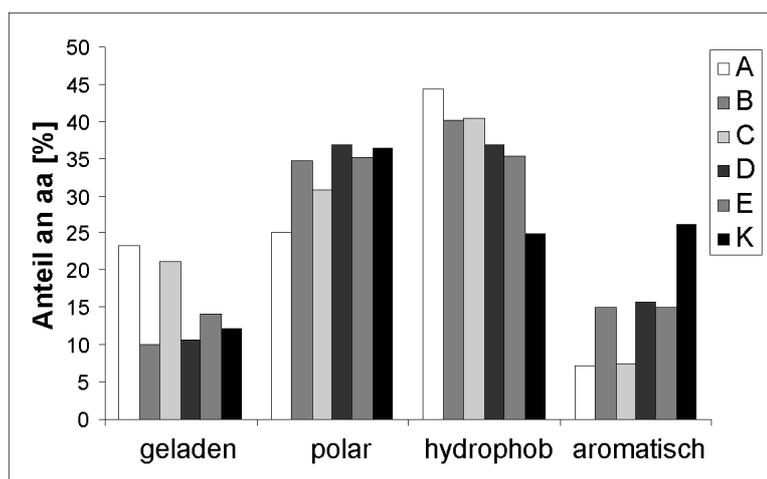


Abbildung 5-34: Verteilung der Aminosäuren nach der Selektion unter verschiedenen Bedingungen. Die Aminosäuren sind nach ihren chemischen Eigenschaften in Gruppen zusammengefasst (Tabelle 5-6). Die Durchführung der Selektionen A-E und K sind in Tabelle 5-9 dargestellt.

Das Vorkommen von aromatischen Aminosäuren in den Peptiden ist im Vergleich mit dem Kontrollexperiment bei allen Selektionen stark vermindert. Auffallend ist, dass in allen Selektionen weniger aromatische Aminosäuren vorkommen, je mehr geladene Reste auftreten. In Selektion A treten im Verhältnis zu allen anderen Selektionen vermehrt hydrophobe Reste auf, dafür sind hier die polaren Reste leicht unterrepräsentiert.

5.6.1 Charakterisierung selektierter Peptide

Aus drei verschiedenen Selektionen wurde aus der Schar an gefundenen Peptidsequenzen jeweils ein Peptid ausgewählt und dieses auf die Bindung an HIV-TAR-RNA hin untersucht. Dazu wurden die Peptide chemisch synthetisiert und am N-Terminus mit einem Fluorescein-Marker versehen, um sie dadurch einer Charakterisierung mittels Fluoreszenz-Titration zugänglich zu machen. Dadurch sollte es möglich sein die Quantität der Bindung zu untersuchen. Zusätzlich sollte die Qualität der Wechselwirkung mit Hilfe von NMR-Experimenten bestimmt werden. Folgende Peptide wurden ausgewählt. Die Bezeichnung der Peptides richtet sich nach der Selektion, aus der die Peptidsequenz stammt.

Pep-A: IRTPRRKIIRSR-Lys(Fluos)-NH₂

Pep-B: LDQHSYHSPFTL-Lys(Fluos)-NH₂

Pep-E: THNPDASTDPHR-Lys(Fluos)-NH₂

Abbildung 5-35: Für die weitere Charakterisierung ausgewählte Peptidsequenzen. Der Buchstabe (A, B, E) bezeichnet die Selektion, aus der das Peptid ausgewählt wurde.

5.6.1.1 Fluoreszenz-Titration

Zunächst sollte die Bindung der Peptide an HIV-TAR durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) mittels Fluoreszenz-Titration (Kap. 4.6.1) quantifiziert werden. Parallel dazu wurde auch der K_D für die Bindung des entsprechenden Peptids an tRNA aus Hefe bestimmt, um die Spezifität des Peptids zu überprüfen. Das jeweilige Peptid wurde in einer Konzentration von 10 nM vorgelegt und HIV-TAR, bzw. tRNA wurde im Bereich von 1 nM bis 100 nM (Endkonzentrationen) zutitriert. Für Pep-E konnte keine Dissoziationskonstante für die Bindung an HIV-TAR ermittelt werden, da anhand der Bindungskurve mehrere Bindungsstellen für das Peptid zu erkennen waren. Die ermittelten Dissoziationskonstanten und Titrationskurven sind im folgenden zusammengestellt.

Tabelle 5-10: Zusammenfassung der ermittelten Dissoziationskonstanten (K_D) für die Bindung der Peptide an tRNA und HIV-TAR-RNA.

	Pep-A	Pep-B	Pep-E
HIV-TAR-RNA	0,87 nM	3,28 nM	
Gesamt-tRNA	0,88 nM	34,1 nM	3,6 nM

Die Dissoziationskonstanten liegen alle im nanomolaren Bereich, d.h. die Bindung ist sehr stark. Allerdings zeigt sich in allen Fällen, dass die Peptide sowohl an die TAR-RNA, als auch an unspezifische Gesamt-tRNA aus Hefe binden. Für Pep-E war es mit dieser Methode nicht möglich, eine Dissoziationskonstante zu bestimmen, da die Fluoreszenz sehr stark zunahm und so die erhaltene Titrationskurve nicht auszuwerten war. Bei der Titration von Pep-A mit TAR-RNA gingen alle Punkte der Messung in den Fit zu Bestimmung des K_D ein, ebenso bei der Messung von Pep-E mit tRNA. Bei der Titration mit tRNA waren es nur die Messpunkte bis zu einer Konzentration von 30 nM, da hier bereits eine Sättigung eintrat. Im Fall von Pep-B wurden die Konzentrationen bis 20 nM berücksichtigt. Bei der Berechnung des K_D der Bindung an tRNA, wurde von einer Bindungsstelle für das Peptid je tRNA-Molekül ausgegangen.

A

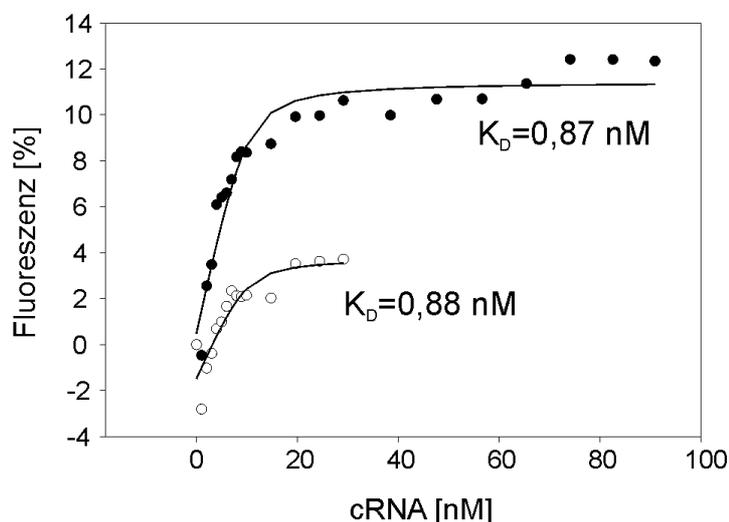


Abbildung 5-36: Titrationskurven für die Bestimmung der Dissoziationskonstante des Peptids Pep-A bezüglich der Bindung an RNA. Es wurden jeweils 10 nM Peptid vorgelegt und HIV-TAR-RNA (schwarz) oder Gesamt-tRNA aus Hefe (weiß) zutitriert. (A) Pep-A

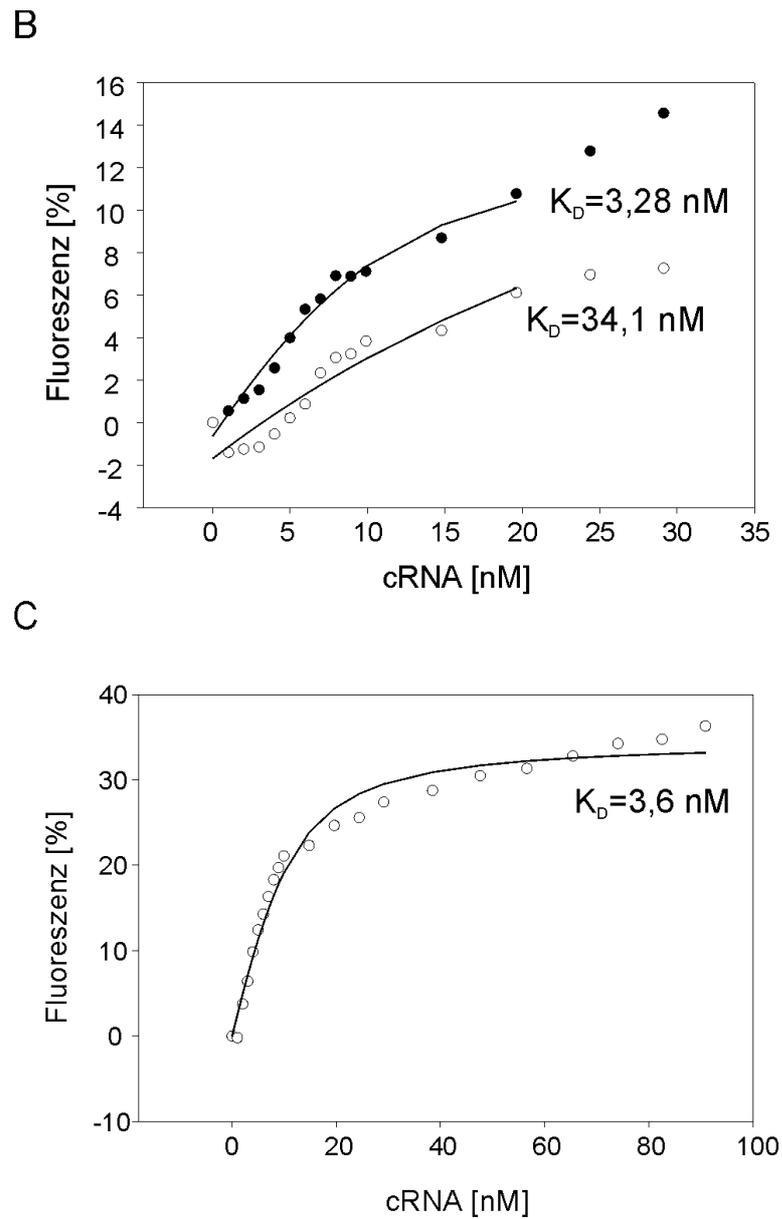


Abbildung 5-37: Titrationskurven für die Bestimmung der Dissoziationskonstante der Peptide Pep-B und Pep-E bezüglich der Bindung an RNA. Es wurden jeweils 10 nM Peptid vorgelegt und TAR-RNA (schwarz) oder Gesamt-tRNA aus Hefe (weiß) zutitriert. (B) Pep-B, (C) Pep-E

5.6.2 Eindimensionale NMR-Spektroskopie an HIV-TAR.

Um die qualitative Bindung der Peptide an HIV-1-TAR zu überprüfen, wurde eine NMR-Titration durchgeführt. Im NMR-Spektrum von RNA kann man jede Resonanz einem Iminoproton einer Base zuordnen, welche Bestandteil eine Watson-Crick-Basenpaares ist. Somit konnte die Spezifität der Bindung kontrolliert werden. Die Zuordnung der Resonanzen der HIV-TAR ist bekannt (Metzger et al., 1997). In den folgenden Abbildungen sind die NMR-Titrations von HIV-TAR-RNA mit dem entsprechenden Peptid dargestellt.

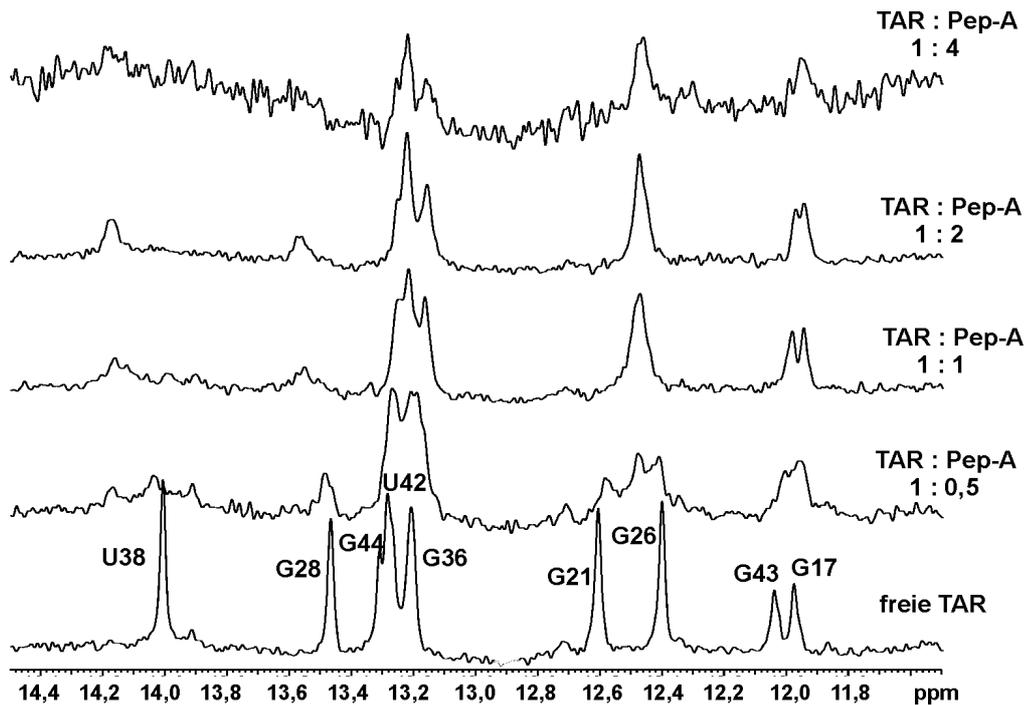


Abbildung 5-38: NMR-Titration von HIV-TAR-RNA mit Pep-A. Dargestellt ist die Iminoprotonenregion der eindimensionalen NMR-Spektren. Die Spektren wurden bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz aufgenommen.

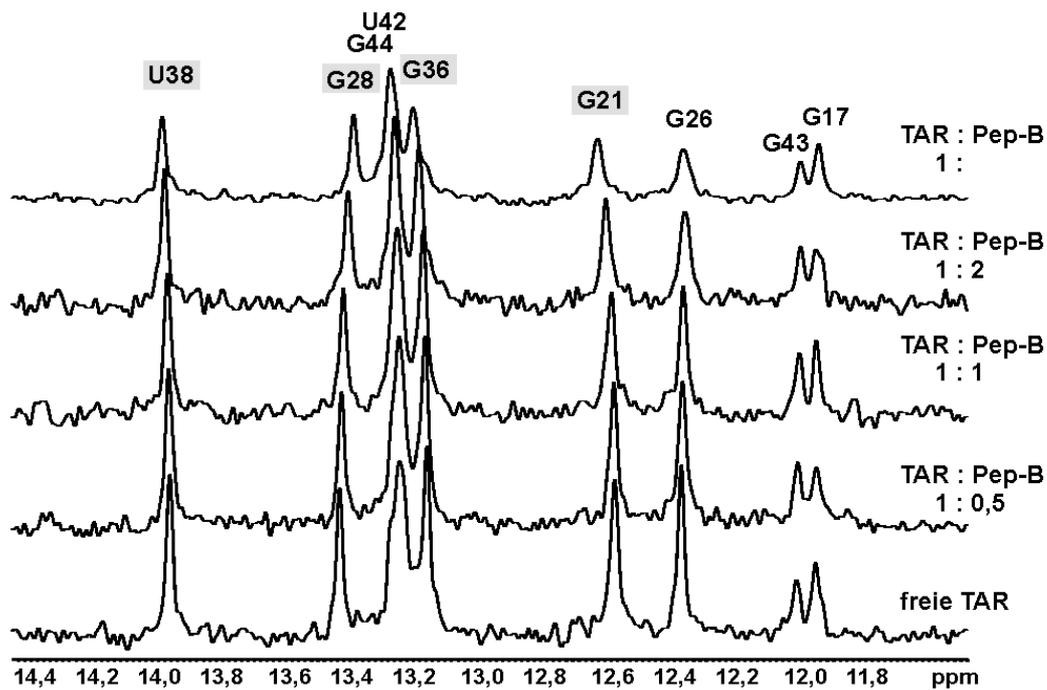


Abbildung 5-39: NMR-Titration von HIV-TAR-RNA mit Pep-B. Dargestellt ist die Iminoprotonenregion der eindimensionalen NMR-Spektren. Die Spektren wurden bei einer Protonenfrequenz von 750 MHz aufgenommen.

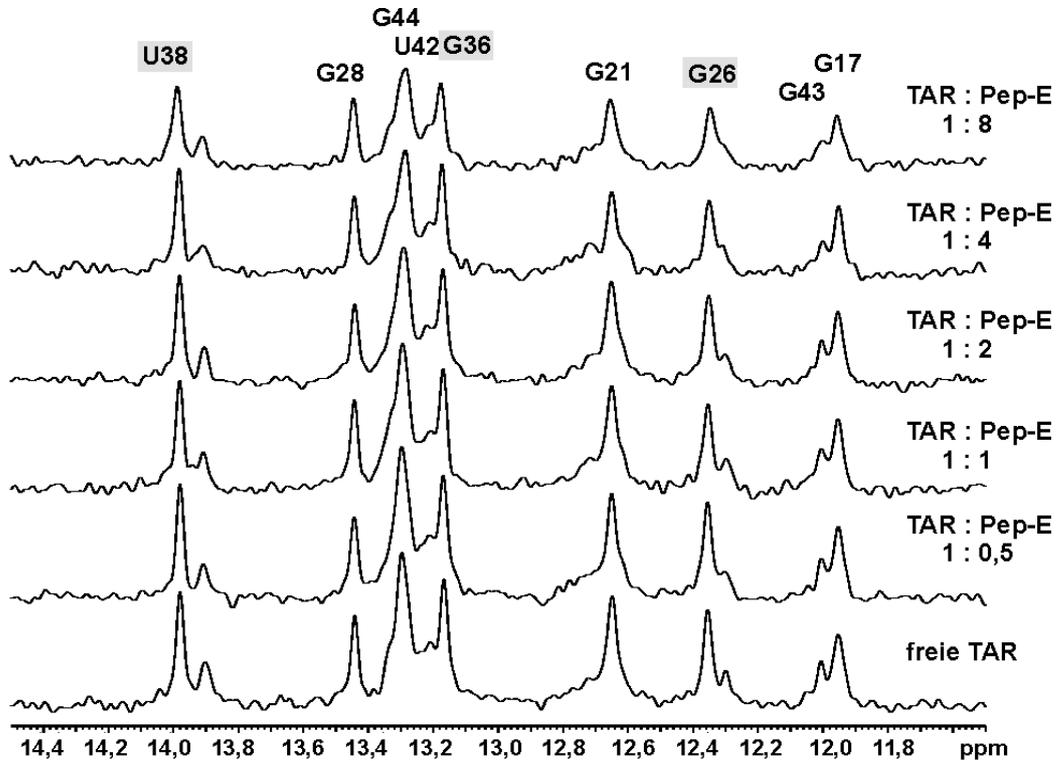


Abbildung 5-40: NMR-Titration von HIV-TAR-RNA mit Pep-E. Dargestellt ist die Iminoprotonenregion der eindimensionalen NMR-Spektren. Die Spektren wurden bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz aufgenommen.

Die Bindung von Pep-B und Pep-E an HIV-TAR-RNA ist hochspezifisch. Dies zeigt sich an der Verschiebung distinkter Iminoprotonensignale. Für Pep-B zeigt sich eine Tieffeldverschiebung für G36 und eine Hochfeldverschiebung für U38, G21 und G36. Bei der Titration von Pep-E kommt es nur zu sehr geringen Verschiebungen, die bei 0,02 ppm liegen. Es handelt sich hierbei um eine Tieffeldverschiebung von G26 und eine Hochfeldverschiebung von U38 und G36. Die entsprechenden Ausschnitte sind in Abbildung 5-41 vergrößert dargestellt. Weiterhin liegt eine Tieffeldverschiebung von G44 oder U42 vor. Die Zugehörigkeit des entsprechenden Signals lässt sich nicht genau beurteilen, da die Signale für diese zwei Basen nicht aufgespalten wurden. Die Bindung von Pep-A an HIV-TAR-RNA erfolgt nicht an einem distinkten Bindungsort. Die Iminoprotonensignale sind nach der Zugabe des Peptids nicht mehr distinkt. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das Peptid an sehr vielen Stellen an die TAR-RNA bindet und diese dadurch sehr viele verschiedene Konformationen einnimmt. Es kommt folglich zu vielen verschiedenen Signalen, die sich gegenseitig zu Null herausmitteln.

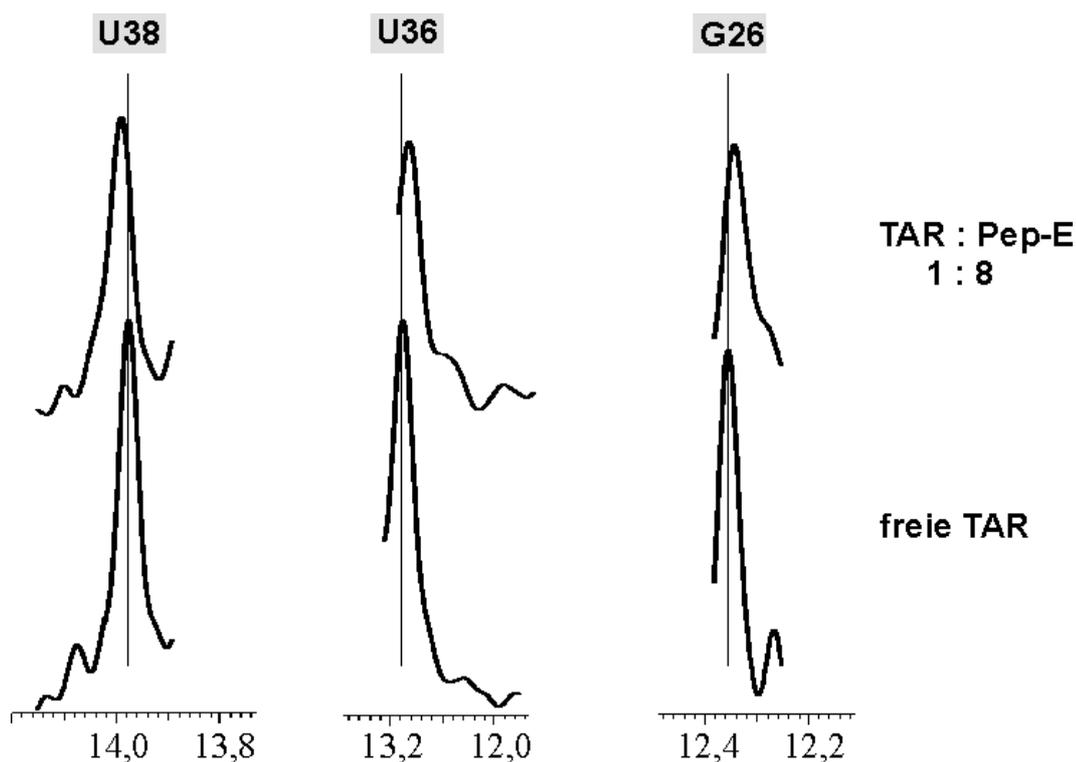


Abbildung 5-41: Vergrößerte Ausschnitte aus der NMR-Titration von HIV-TAR-RNA mit Pep-E. Dargestellt ist jeweils die freie TAR-RNA und der Endpunkt der Titration.

6 Diskussion

6.1 Etablierung eines ternären Phagendisplay-Systems

Phagen-Display-Experimente dienen in den meisten Fällen der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Sie werden für die Suche nach Antikörpern oder der Bestimmung eines Bindungsmotives eingesetzt und bei diesen Verfahren kommen in der Regel Epitop-Bibliotheken zur Anwendung (Winter et al., 1994; Kay, 1994; Sparks et al., 1994; McCafferty et al., 1990). Im Gegensatz dazu gewinnen Phagen-Display-Studien, in denen Nukleinsäuren als Liganden dienen, erst in den letzten Jahren an Bedeutung. So ist mit Hilfe von *in vitro*-Selektionen die Identifikation neuer Nukleinsäure-bindender Peptide möglich, die vor allem für die Entwicklung von Inhibitoren der RNA-Transkription von großer Bedeutung sind (Kap. 1.4.3). Ein weiterer neuartiger Ansatz ist die Identifizierung und Klonierung von RNA-bindenden Proteinen aus cDNA-Banken. Hierbei wird eine cDNA-Bank auf T7-Phagen präsentiert und auf die Bindung an eine bestimmte RNA selektiert (Danner and Belasco, 2001).

Ein System für die Untersuchung von RNA-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe der Phagen-Display-Technik stellt das HIV-1-Tat-TAR-System dar (Hoffmann & Willbold, 1997). Dieses Phagen-Display beruht auf der Verwendung von pAK-Phagmiden (Krebber et al., 1996a). Diese kodieren für ein N-terminal stark verkürztes Gp3-Protein (Gp3ss), welches im Gegensatz zum Wildtyp-Gp3 mit 8 Cysteinen nur noch zwei Cysteine aufweist, die gepaart im Inneren der Phagenhülle liegen. Damit sollte es zu geringeren Problemen bei Fusionen mit stark cysteinhaltigen Proteinen, wie es das Tat-Protein ist, kommen. Des weiteren enthält das Gp3ss keine Glycin-Linker (Kap.1.4.1), wodurch Fusionsproteine stabiler präsentiert werden können, da kompaktere Moleküle weniger anfällig für zelluläre Proteasen sind. Die Funktionalität des Systems wurde mittels einer Testselektion von Tat-präsentierenden Phagen gegen Tat-mtRRRR-präsentierende Phagen (R53A, R55A, R56A, R57A) und Phagen, die kein Tat präsentierten, überprüft (Hoffmann & Willbold, 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte das System auf ein ternäres System erweitert werden. Dies war notwendig, da mittlerweile bekannt ist, dass der zelluläre Kofaktor Cyclin T1 für eine optimale Bindung von HIV-Tat an HIV-TAR-RNA essentiell ist (Wei et al., 1998).

Cyclin T1 steigert die Affinität und Spezifität von HIV-Tat zur TAR-RNA

Mit Hilfe der Bestimmung der relativen Bindungsfaktoren von pAK-*tat*-wt-präsentierenden Phagen und pAK-*tat*-mt8bas-präsentierenden Phagen konnte gezeigt werden, dass Cyclin T1 im Phagen-Display voll funktionell ist. In der Mutante Tat-mt8bas sind alle acht basischen

Aminosäuren des „arginine rich motif“ (ARM) durch Alanine ersetzt. Da dem ARM eine große Bedeutung für die Bindung von HIV-Tat an TAR-RNA zugeschrieben wird (Hauber et al., 1989), hätte man erwartet, dass diese Tat-mt8bas-Variante nur eine sehr geringe Tat-Bindungsaktivität in Abwesenheit von Cyclin T1 besitzt. Überraschenderweise besitzen die Tat-mt8bas-präsentierenden Phagen jedoch noch eine partielle Bindungsaktivität. Für Tat-mt8bas-präsentierende Phagen wird die relative Bindungsfähigkeit im Vergleich zu Tat-wt nur um den Faktor 3,5 in Abwesenheit bzw. um den Faktor 4,7 in Anwesenheit eines Überschusses an unspezifischer Hefe-tRNA reduziert. Die Anwesenheit von Cyclin T1 in den Experimenten zur Bestimmung der relativen Bindungsfähigkeit führt zu einer Erhöhung der Affinität beider pAK-*tat*-Phagen-Varianten. Cyclin T1 liegt vollkommen funktionell im ternären Phagen-Display vor und erhöht im Phagen-Display-System sowohl die Affinität (Abbildung 5-4), als auch die Spezifität der Bindung von HIV-Tat an TAR-RNA (Abbildung 5-5). Die TAR-Bindung ist demnach sowohl von Cyclin T1 als auch von der Anwesenheit des ARMs abhängig.

Mutationen im Bereich des ARMs beeinflussen nicht die Bindung von HIV-Tat an Cyclin T1. Das steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass eine Tat-Mutante, in der alle basischen Reste des ARMs durch Glycine ausgetauscht wurden, noch in der Lage ist, an Cyclin T1 zu binden (Kwak et al., 1999).

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Änderungen der relativen Bindungsfaktoren tatsächlich von Cyclin T1 verursacht werden, wurden die relativen Bindungsfaktoren in der Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Cyclin T1 bestimmt. Diese Untersuchungen wurden unter spezifischen Bedingungen, d.h. in der Gegenwart von Kompetitor-RNA durchgeführt. Die relativen Bindungsfaktoren für Tat-wt-präsentierende Phagen zeigen eine deutliche Dosisabhängigkeit für die Anwesenheit von Cyclin T1 (Abbildung 5-6), die auch unabhängig von dem Hexahistidinanhang des verwendeten His-hCycT1(272Δ) ist (Jonas et al., 2001).

Alle Komponenten des ternären Systems sind unter Selektionsbedingungen funktionell

Um zu überprüfen, ob alle Komponenten des ternären Phagen-Display-Systems unter Selektionsbedingungen tauglich sind, wurde eine vereinfachte „Biopanning“-Prozedur (Kap. 5.1.4) durchgeführt. Hierbei wurde ein Gemisch aus Tat-wt- und Tat-mt8bas-präsentierenden Phagen sowohl in Abwesenheit, als auch in Anwesenheit von Cyclin T1 auf ihre Bindung an TAR-RNA selektiert. Beide Selektionen wurden in Gegenwart von Kompetitor-RNA durchgeführt. Die pAK-*tat*-mt8bas Phagen wurden in einem 5000-fachen Überschuss eingesetzt. Die Selektion verlief über drei Runden und der Verlauf der Selektion wurde mittels PCR-Produktlängenanalyse verfolgt (Abbildung 5-8). Drei Selektionsrunden führten zu einer 2000-fachen bzw. 1000-fachen Anreicherung von Tat-wt-präsentierenden Phagen in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Cyclin T1. Es scheint zunächst überraschend, dass die

Anreicherung von Tat-wt-präsentierenden Phagen in Abwesenheit von Cyclin T1 höher ist, als in Anwesenheit. Es bedeutet aber, dass in Anwesenheit von Cyclin T1 der Selektionsvorteil von Tat-wt geringer ist als in Abwesenheit des Kofaktors. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit den relativen Bindungsfaktoren überein (Abbildung 5-4). Der Vergleich der relativen Bindungsfaktoren von Tat-wt- und Tat-mt8bas-präsentierenden Phagen in Gegenwart von unspezifischer tRNA, aber ohne Cyclin T1 ergibt ein Verhältnis von 4,8. Das entsprechende Verhältnis der Bindungsfaktoren in Anwesenheit von Cyclin T1 führt zu einem Wert von 3,6. Dies stellt einen Unterschied von 25 % dar. Mit Hilfe der Ergebnisse der Testselektion kann man einen Anreicherungsfaktor, gemittelt über drei Selektionsrunden, berechnen. Dieser liegt bei 12,6 für die Abwesenheit von Cyclin T1 und bei 10,0 für die Anwesenheit von Cyclin T1. Auch hier liegt der Unterschied zwischen den Werten bei 25 % (Jonas et al., 2001). Sowohl das phagenpräsentierte Tat, als auch das Cyclin T1 sind also im ternären Phagen-Display-System voll funktionell.

Außerdem geht aus diesen Ergebnissen hervor, dass die Arginine des ARMs für die RNA-Bindung keine so entscheidende Rolle zu spielen scheinen, wie bisher angenommen. Der Erhalt von RNA-Bindungsaktivität trotz des Austausches mehrerer Arginine eines ARMs ist auch für das N-Protein des Phagen λ beschrieben worden. Durch den Austausch von drei Argininen durch Alanine, wurde im Vergleich zum Wildtypprotein eine Verringerung der Antiterminationsaktivität *in vivo* um 50 % beobachtet. Das veränderte Protein ist aber dennoch in der Lage, *in vitro* an sein zugehöriges RNA-Element, NusA, zu binden (Gusarov & nudler, 2001).

6.2 Selektion der Tat-random-Bibliotheken

Die bisher durchgeführten Phagen-Display-Studien auf Basis von Protein-RNA-Wechselwirkungen dienten dazu, die Bindung eines Proteins an seine RNA genauer zu charakterisieren. Ein erstes Experiment solcher Art gelang mit der Präsentation der RNA-bindenden Domäne des spleißosomalen Proteins U1A (Laird Offringa and Belasco, 1995) und später mit der Untersuchung von Zink-Finger-Bindungsmotiven (Friesen and Darby, 1997). Im Fall von U1A bestand die verwendete Bibliothek aus nur 512 unterschiedlichen Ausgangsvarianten. An den neun U1A-Sequenzpositionen, die mit der U1A-Ziel-RNA interagieren, wurde entweder die Wildtyp-Aminosäure zugelassen, oder der Rest, der an dieser Sequenzposition in der hochhomologen RNA-bindenden Domäne des snRibonukleoproteins U2B'' vorliegt (Kap. 1.4.3). Aus dieser kleinen Zahl von Ausgangsvarianten wurden Peptide selektiert, die hochaffin an die Ziel-RNA binden. Im anderen Fall des Zink-Finger-Bindungsmotives wurde eine Bibliothek ausgehend von Zink-Finger 4 aus TFIIIA aus *Xenopus laevis* konstruiert. Hier wurden die Aminosäuren an den Positionen -1, +2, +3 und +6 der α -Helix vollständig randomisiert. Von diesen Resten war

bekannt, dass sie direkt mit der RNA interagieren. Die resultierende Bibliothek wurde auf die Bindung an 5S rRNA selektiert. Es konnten Zink-Finger-Motive gefunden werden, die mit ähnlicher Affinität an die RNA binden, wie der Wildtyp-Zink-Finger. Des Weiteren konnten mit diesem Experiment Aussagen über die Art der Erkennung der RNA gemacht werden. Dabei wurde deutlich, dass RNA in ähnlicher Weise durch Zink-Finger-Bindungsmotive erkannt wird, wie die DNA.

Für HIV-Tat gibt es keine Untersuchungen darüber, welche Aminosäuren in der Gegenwart von Cyclin T1 direkt mit der TAR-RNA interagieren und wie wichtig jede einzelne Wechselwirkung für die Bindung an HIV-TAR-RNA ist. In einer ganzen Reihe von Arbeiten wurden synthetische HIV-Tat-Peptide oder HIV-Tat-Peptid-Varianten in Bezug auf ihre Bindungsfähigkeit an HIV-TAR-RNA (Kamine et al., 1991; Weeks et al., 1993) und weiterhin auf ihre Transaktivierungsfähigkeit untersucht (Calnan et al., 1991b; Delling et al., 1991; Tao & Frankel, 1993; Vives et al., 1994). In allen diesen Studien zeigt sich, dass der Austausch eines einzelnen Argininrestes gegen ein Alanin keine Auswirkung auf die Dissoziationskonstante (K_D) hat, während der Austausch von zwei Argininen zu einer Erhöhung des K_D um bis zu zwei Größenordnungen führt. Diese Arbeiten wurden allerdings ohne Cyclin T1 durchgeführt, da zu dieser Zeit der Einfluss von Cyclin T1 auf die Tat-TAR-Bindung noch nicht bekannt war.

Die basische Sequenzdomäne zwischen den Tat-Proteinen aller HIV-1-Isolate ist nahezu vollständig konserviert und das, obwohl Retroviren für ihre hohen Mutationsraten bekannt sind (Modrow and Falke, 1997). Die Frage stellt sich also, ob diese Konservierung der basischen Reste allein auf die Notwendigkeit für die Tat-TAR-Wechselwirkung zurückzuführen ist. Die basische Sequenzdomäne von HIV-1 Tat dient nicht nur der Bindung an HIV-TAR-RNA (Dingwall et al., 1989; Cordingley et al., 1990; Weeks et al., 1990), sondern auch als Kernlokalisationssequenz („nuclear leading sequence“, NLS) (Siomi et al., 1990; Kuppaswamy et al., 1989; Truant & Cullen, 1999). Des Weiteren ist dieser Sequenzabschnitt für eine durch das Tat-Protein hervorgerufene Schädigung des Zentralnervensystems verantwortlich (Hayman et al., 1993; Philippon et al., 1994) und bestimmt das fusionierende Potential von Tat (Vives et al., 1997; Fawell et al., 1994). Somit sind auf diesem sehr kleinen, nur zehn Aminosäuren umfassenden Sequenzabschnitt mindestens vier verschiedene Funktionen enthalten. In der hier vorliegenden Arbeit sollte hingegen die Rolle der basischen Reste für die Bindung an HIV-TAR in An- und Abwesenheit von Cyclin T1 untersucht werden.

pAK-tat-random-Bibliotheken wurden in einer ausreichenden Größe konstruiert

Für die Selektion von HIV-Tat wurden zwei Tat-random-Bibliotheken konstruiert, in denen jeweils vier Aminosäuren der basischen Sequenzdomäne vollständig randomisiert wurden. Die cysteinreiche Sequenzdomäne von HIV-Tat besitzt fünf Cysteine. Dadurch basierten

diese Bibliotheken auf einer ungeraden Anzahl an Cysteinen. Die Selektion wurde unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, so dass die Anzahl an Cysteinen keine Bedeutung haben sollte. Reinfektion der Bakterien und deren Anzucht erfolgte allerdings in sauerstoffreichen Medium, wodurch Varianten mit einer auf das gesamte Protein bezogenen geraden Anzahl an Cysteinen bevorzugt werden könnten. Das würde zu einer Anhäufung an einer ungeraden Anzahl an Cysteinen an den randomisierten Positionen führen. Deshalb wurde zusätzlich eine Tat-random-Bibliothek konstruiert, bei der Cystein 31 durch Serin ersetzt ist und dadurch in der Ausgangsbibliothek eine gerade Anzahl an Cysteinen vorlag. Alle drei Bibliotheken konnten nach Optimierung des Ligationsverhältnisses in einer ausreichenden Größe konstruiert werden. Es zeigte sich außerdem, dass die Transformationseffizienz der Ligationsansätze stark von der Qualität der elektrokompenten Zellen abhängig ist. Mit einer Anzahl an unabhängigen Klonen zwischen $1,1 \times 10^6$ und $1,5 \times 10^6$ war eine ausreichende Diversität der Bibliotheken gesichert.

6.3 Die Selektion hat Tat-Varianten ergeben, die an HIV-TAR-RNA binden

Basische Aminosäurereste haben nur einen geringen Anteil an der Tat-TAR-Bindung

Mit dem Hintergrund älterer Studien zur Bedeutung der basischen Sequenzdomäne für die Bindung an HIV TAR-RNA (Churcher et al., 1993; Kamine et al., 1991) hätte man erwartet, dass sich nach der Selektion der Phagen-Display-Bibliotheken an den randomisierten Aminosäurepositionen Reste mit basischem Charakter, und dabei bevorzugt Arginine, durchsetzen würden.

Im Modell des Tat-TAR-Komplexes wird gezeigt, dass die Arginine R53, R55, R56 und R57 von der RNA-Helix wegweisen und keinen direkten Kontakt mit dem Phosphatrückgrat der TAR-RNA eingehen. Das würde bedeuten, dass die Aminosäurereste an den Positionen R49, K50, K51 und R52 von HIV-Tat weitaus wichtiger für die Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat sind. Dies führt zu der Vermutung, dass im Fall der Selektion der Tat-RKKR-random-Bibliothek eher basische Reste auftreten, als bei der Selektion der Tat-RRRR-random-Bibliotheken.

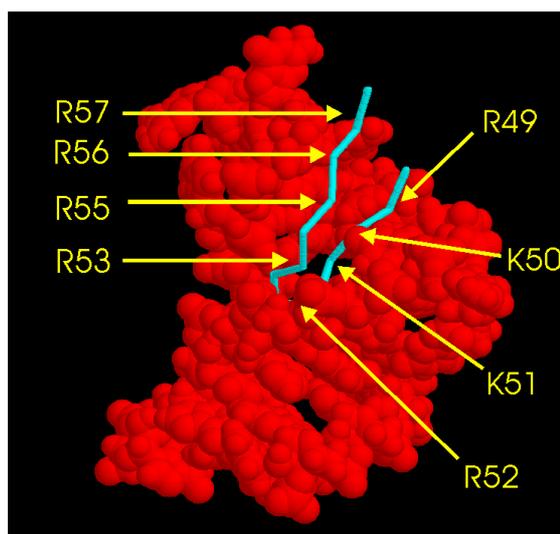


Abbildung 6-1: Modell des HIV-Tat-TAR-Komplexes (nach Seewald, 1998)

Die Analyse der Sequenzen der selektierten Tat-Varianten bezüglich des Gehalts an geladenen Aminosäuren zeigt deutlich, dass dies nicht der Fall ist (Kap. 5.4). In den gesamt 72 analysierten Sequenzen aus Selektionen der Tat-RKKR-random-Bibliotheken treten nur sechs Arginine (2,1 %) auf, während in den Sequenzen aus Selektionen der Tat-RRRR-random-Bibliotheken in 95 Sequenzen 21 Arginine (5,5 %) und zwei Lysine (0,5 %) vorkommen. Bei einer gleichmäßigen Verteilung aller Aminosäuren würde jeder Rest mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 % auftreten. Die Testselektionen und die Bestimmung der Anreicherungsfaktoren von Tat-wt- und Tat-mt8bas-präsentierenden Phagen gibt bereits einen ersten Hinweis darauf, dass die basischen Aminosäuren in Gegenwart des zellulären Kofaktors Cyclin T1 eine geringere Rolle spielen, als bisher angenommen. Daher war es nicht allzu erstaunlich, dass nach der Selektion in keiner der untersuchten Klone die Tat-wt-Sequenz zu finden war. Andererseits könnte dies aber auch darauf zurückzuführen sein, dass Phagen, bei denen gehäuft geladene Reste im randomisierten Bereich auftraten einen Selektionsnachteil hatten, da die Anhäufung von geladenen Resten zu einem Verlust des Proteintransports durch die *E.coli* Membran führt (Kuhn, 1995). Dass dies nicht unbedingt der Fall sein muss konnte durch die funktionelle Präsentation von Tat-wt auf Phagen gezeigt werden. Trotzdem könnten Tat-wt-Phagen die Membran mit geringerer Effizienz durchqueren als Phagen, die ein Tat-Protein mit weniger geladenen Resten präsentieren. Anhand der Selektion der Ph.D 12 Phagenbibliothek (Kap. 5.6) konnte gezeigt werden, dass in den erhaltenen Peptiden teilweise bis zu sechs Arginine auftreten können und eine hohe Anzahl an Argininen keinen entgegengesetzten Selektionsdruck darstellt.

Für die weitere Charakterisierung wurden aus den erhaltenen Sequenzen solche ausgewählt, die mehrfach auftraten (Tat-VPGW, Tat-GDQF, Tat-PMQD, Tat-LQPLR, Tat-GQCIR, Tat-GQLSL, Tat-C31S-EQLSG). Des weiteren wurden solche Sequenzen betrachtet, die zwar nur vereinzelt auftraten, aber basische Reste enthielten (Tat-RIVK, Tat-SQGRL). Tat-EQLSG

wurde näher betrachtet, da diese Sequenz auch in der C31S-Bibliothek auftrat und Tat-C31S-GQGGC, da es zu einer Anhäufung von Glycinen kam (Tabelle 5-7). Zusätzlich wurden die Varianten Tat-mtRKKR, Tat-mtRRRR und Tat-mt8bas betrachtet. Die Tat-Varianten wurden nun auf folgenden Eigenschaften näher charakterisiert:

- ▶ *in vitro* Aktivität, d.h. Bindung an TAR-RNA in An- und Abwesenheit von Cyclin T1
- ▶ Transaktivierungsfähigkeit des HIV-LTR *in vivo*
- ▶ Lokalisation in der Zelle

Die Ergebnisse dieser Charakterisierung sind Tabelle 6-1 zusammengefasst.

Tabelle 6-1: Eigenschaften der charakterisierten Tat-Varianten.

Tat-Variante	aus Selektion +/- Cyclin T1 erhalten ^a	Bindung an TAR-RNA ^b	Bindung an TAR-RNA mit Cyclin T1 ^b	Aktivierung des HIV-1- LTR	Lokalisation in der Zelle ^c
Tat-wt ¹		+	+	13,1	K
Tat-EQLSG ²	-	-	+	3,3	gK + C
Tat-SQGRL	-	+	+	4,8	gK + C
Tat-CQLSL	+	+/-	+	10,2	K
Tat-GQCIR	+	-	+	12,8	K
Tat-LQPLR	+	+	+	12,7	K
Tat-C31S- EQLSG	-/+	-	+	6,2	K + C
Tat-C31S- GQGGC	-	+	+	7,5	K + C
Tat-mtRRRR ³		+/-	+	9,9	K
Tat-RIVK ⁴	+	-	+	6,7	K + C
Tat-VPGW	-	+	+	2,2	C
Tat-GDQF	+	+	+	6,7	K + C
Tat-PMQD	+	+	+	9,7	K
Tat-mtRKKR ⁵		+/-	+	4,4	gK + C
Tat-mt8bas ⁶		+/-	+	3,7	C

^a (+) Selektion in Anwesenheit von Cyclin T1, (-) Selektion in Abwesenheit von Cyclin T1, (+/-) Vorkommen in beiden Selektionen

^b (+) starke Bindung, (+/-) schwache Bindung, (-) keine Bindung

^c Lokalisation im Kern (K), im Cytoplasma (C), geringe Lokalisation im Kern (gK)

¹⁻⁶ Ausgangssequenz der Varianten:

- 1) RKKRRQRRRR (Tat-wt)
- 2) RKKRXQXXX
- 3) RKKRAQAAA
- 4) XXXXRQRRR
- 5) AAAARQRRR
- 6) AAAAAQAAA

Die Selektion der HIV-Tat-Varianten erfolgte aufgrund der Bindung an HIV-TAR-RNA

Bei der Betrachtung der Gelretardationsexperimente wird deutlich, dass mit Ausnahme der Variante Tat-EQLSG alle Tat-Varianten im binären System an TAR-RNA binden, die aus Selektionen ausgewählt wurden, welche in Abwesenheit von Cyclin T1 durchgeführt wurden. Umgekehrt besitzen mit Ausnahme der Variante Tat-C31S-EQLSG nur Tat-Varianten aus Selektionen in Anwesenheit von Cyclin T1 keine TAR-Bindungsfähigkeit ohne den Kofaktor. Damit ist belegt, dass mit dem Selektionssystem tatsächlich Tat-Varianten angereichert wurden, die unter den jeweiligen Bedingungen an HIV-TAR-RNA binden.

Die Varianten Tat-EQLSG und Tat-C31S-EQLSG

Tat-Varianten mit der Sequenz EQLSG treten sowohl in der Selektion der Tat-mtRRRR-random-Bibliothek ohne Cyclin T1 auf (einer von 23 Klonen), als auch in der Selektion der Tat-C31S-mtRRRR-random-Bibliothek. Interessanterweise wird hier diese Variante in Anwesenheit (drei von 20 Klonen) und Abwesenheit von Cyclin T1 (neun von 28 Klonen) selektiert. Obwohl Tat-EQLSG aus der Selektion ohne Cyclin T1 stammt, besitzt es unter den Bedingungen des Gelretardationsexperimentes keine TAR-Bindungsaktivität. Die Variante Tat-C31S-EQLSG wurde unter binären und ternären Selektionsbedingungen erhalten. Sie kann aber genau wie Tat-EQLSG ohne den Kofaktor nicht an TAR-RNA binden. Allerdings wurden die binären Gelretardationsexperimente in Gegenwart eines 20-fachen Überschusses an Kompetitor-tRNA durchgeführt, während in der Selektion nur ein 10-facher Überschuss eingesetzt wurde. Im *in vitro* Experiment verhalten sich die beiden Tat-EQLSG-Varianten unabhängig von der Mutation des Cystein 31. Die Besetzung dieser Aminosäureposition mit einem Cystein oder einem Serin hat keinen Einfluss auf die Ausbildung des Tat-TAR-Cyclin T1-Komplexes. Das Motiv EQLSG scheint unter Selektionsbedingungen einen enormen Vorteil zu besitzen, da diese Variante gleich in drei von vier Selektionen auftrat.

Alle selektierten Tat-Varianten binden in Anwesenheit von Cyclin T1 an TAR-RNA

In Gegenwart von Cyclin T1 konnte für alle untersuchten Tat-Varianten im Gelretardationsexperiment die Bindung an HIV-TAR-RNA in Gegenwart eines 40fachen Massenüberschusses an tRNA nachgewiesen werden (Abbildung 5-26). Die Ausbildung des Tat-TAR-Cyclin T1-Komplexes scheint dabei vollkommen unabhängig von der Aminosäurebesetzung der randomisierten Positionen in der basischen Sequenzdomäne zu sein. Wie für Cyclin T1 beschrieben, bewirkt es eine Steigerung der Affinität und Spezifität der Bindung von HIV-Tat an TAR-RNA (Wei et al., 1998; Emerman and Malim, 1998).

Die Tat-mt8bas-Variante besitzt im binären System eine geringe, aber dennoch detektierbare Bindungsaktivität. Dies stimmt mit den Beobachtungen der Testselektion (Kap. 5.1.4)

überein. Die Varianten Tat-mtRKKR und Tat-mtRRRR können ohne Cyclin T1 nur schwach an TAR-RNA binden. Es sind weitere Hinweise darauf, dass das ARM bei der Bindung von HIV-Tat an TAR-RNA keine so bedeutende Rolle spielt, wie bisher angenommen. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen über die Bindung des spleißosomalen Proteins U1A an U1hpII-RNA. Durch Analyse der Bindungskinetik konnte nachgewiesen werden, dass sich Protein und RNA durch die positiven Reste des Proteins und das negativ geladene Phosphatrückgrat der RNA elektrostatisch anziehen. Danach folgt ein schneller „induced fit“, durch den der Komplex in eine stabile Konformation gelangt. Die positiven Reste spielen demnach nur für die erste Erkennung, nicht aber für die eigentliche Bindung eine Rolle (Katsamba et al., 2001).

Alle selektierten Varianten können rein sterisch an TAR-RNA binden

Durch die Modellierung der selektierten HIV-Tat-Varianten in ein Modell des Tat-TAR-Komplexes, sollten sterische Kriterien der Tat-TAR Wechselwirkung betrachtet werden. Wegen der Problematik einer exakten Parametrisierung der elektrostatischen Wechselwirkungen wurden hier nur die van der Waals Wechselwirkungen betrachtet, um eine Aussage darüber zu machen, welche der modellierten Komplexe unter sterischen Gesichtspunkten möglich erscheinen. Alle der modellierten Peptide wiesen einen RMSD für das Phosphatrückgrat von weniger als 0.3 Å zur Startstruktur auf (Tabelle 5-8). Die größten Abweichungen wurden dabei für Peptide erhalten, in denen sich ein Prolin befindet. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf die charakteristische Geometrie des Proteinrückgrats bei Prolinen zurückzuführen und weniger auf spezifische Eigenschaften der Seitenkette. Die große Zahl, bzw. Variation an tolerierten Aminosäuren, die aus diesen Modellierungsstudien erhalten wurde, stimmt auch mit den Ergebnissen des Phagendisplay überein, in dem kein distinktes Konsensusmotiv gefunden wurde. Die argininreiche Sequenzdomäne von HIV-Tat nimmt keine diskrete Struktur ein und hat so eine dynamische Konformation im Tat-TAR-Komplex (Calnan et al., 1991a; Aboul ela et al., 1995; Bayer et al., 1995; Tan and Frankel, 1995). So betrachtet benötigt HIV-Tat keine ausgeprägten Sekundärstrukturelemente für die Bindung an TAR-RNA. Trotz der beobachteten Toleranz gibt es dennoch auch Peptide, die nur sehr schlecht räumlich in die Sequenz der TAR-RNA zu modellieren sind. Das wird am Beispiel der Negativkontrolle deutlich. Diese Toleranz an Aminosäureresten und Sequenzen aus den Selektionen der Tat-mtRRRR-random Bibliothek könnte darauf zurückgeführt werden, dass die entsprechenden Sequenzpositionen (R53, R55, R56, R57) nicht unbedingt für eine Wechselwirkung mit TAR-RNA notwendig sind, was gut mit dem Modell (Abbildung 6-1) des Tat-TAR-Komplexes übereinstimmt.

Die bisher durchgeführten Experimente über die Bedeutung der einzelnen Aminosäurereste des ARMs für die Wechselwirkung von HIV-Tat und HIV-TAR-RNA stammen aus einer

Zeit, in der Cyclin T1 noch unbekannt war. Es wurde allerdings gezeigt, dass eine um das ARM verkürzte Tat-Variante (aa 1-48) keinen ternären Tat-TAR-Cyclin T1-Komplex ausbilden kann (Wei et al., 1998). In dieser Arbeit konnten aus einer Tat-mtRKKR-random-Bibliothek Tat-Varianten selektiert werden, die an TAR-RNA binden. Keine der untersuchten Varianten wies an Position 52 ein Arginin auf. Gerade diesem hochkonservierte Arginin (R52) wird, vermutlich durch die Bildung eines Wasserstoffbrücken-Netzwerks zum Phosphatrückgrat der TAR-RNA, ein großer Teil der Bindungsspezifität von Tat zugeschrieben wird (Calnan et al., 1991b; Tao and Frankel, 1992). Diese Experimente wurden allerdings nur mit verkürzten Tat-Peptiden durchgeführt und nicht mit dem gesamten Tat-Protein. Diese Verschlechterung der Bindungsaktivität ist demnach eventuell auch auf die Kürze des Peptids und nicht nur auf den Verlust von R52 zurückzuführen. Des weiteren wurde mit Bindungsexperimenten mit synthetischen HIV-Tat-Peptiden gezeigt, dass die Substitution eines einzelnen basischen Restes zu keiner wesentlichen Erhöhung der Dissoziationskonstanten (K_D) führt, während der Austausch von gleich zwei Resten eine Verminderung des K_D um mindestens das 20-fache zur Folge hat (Calnan et al., 1991b). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch Tat-Varianten, in denen vier der basischen Reste ausgetauscht wurden, noch an TAR-RNA binden können. Die basische Sequenzdomäne ist nicht allein ausschlaggebend für die Affinität und Spezifität der Tat-TAR-Bindung. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Studien. So liegt die Dissoziationskonstante von HIV-TAR mit einem Peptid bestehend nur aus Kern-, basischer- und glutaminreicher Sequenzdomäne (aa 37-72) bei 100 nM und mit HIV-Tat bei 2,6 nM (Churcher et al., 1993). In diesen Experimenten wurde als Kompetitor keine unspezifische tRNA eingesetzt, sondern einer Variante von HIV-TAR. Daher lassen sich die Aussagen über die Spezifität der Tat-TAR-Bindung nur schwer mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichen, in denen die Bindung der Tat-Varianten durch die Zugabe eines 40-fachen Überschusses an unspezifischer tRNA verhindert wird (Abbildung 5-25).

6.4 Alle selektierten Varianten besitzen *in vivo* Aktivität

Da alle ausgewählten Tat-Varianten durch die Gegenwart von Cyclin T1 die Fähigkeit zur Bindung an TAR-RNA erlangten, war die Frage interessant, ob die Varianten *in vivo* Aktivität besitzen. Die Transaktivierungsaktivität der ausgewählten Varianten wurde mit Hilfe eines dualen Luciferase Assays bestimmt (Kap. 5.5.3.1). Es stellte sich heraus, dass Tat-wt mit einer 13,1-fachen Transaktivierungsaktivität die größte und Tat-VPGW mit 2,2-fach die geringste Aktivität besitzt. Die Aktivität der Varianten, deren Aminosäuresequenz einen ähnlichen Charakter besitzen wie Tat-wt (Tat-GQCIR, Tat-LQPLR, Tat-CQLSL) liegt im gleichen Bereich wie Tat-wt. Tat-GQCIR und Tat-LQPLR besitzen mit 12,7 und 12,8 sogar eine genauso große Aktivität. Eine Rolle hierfür spielt möglicherweise das Arginin an Position 57, welches auch in Tat-wt an dieser Stelle vorliegt. Möglicherweise ist hier die Positionierung eines einzelnen Argininrestes in Bezug auf die Positionen R49, K50, K51 und

R52 von Bedeutung. Eine solche korrekte Positionierung ist bereits bei der Bindung des Tat-Proteins des „Membrana Disease Virus“ (JDV) an HIV-TAR-RNA beschrieben worden (Smith et al., 2000). Es konnte durch Mutationsexperimente gezeigt werden, dass JDV-Tat nicht nur an seine eigene JDV-TAR-RNA, sondern auch an HIV-TAR-RNA binden kann, wenn auch in einem komplett anderen Mechanismus. Die Bindungsaktivität von JDV-Tat ist dabei nur von der korrekten Positionierung eines einzelnen Argininrestes (R70) abhängig, der mit G26 in Kontakt tritt, während die Bindung an JDV-TAR-RNA durch die Ausbildung eines β -Faltblattes bewirkt wird.

Fast alle Tat-Varianten lokalisieren zumindest zum Teil im Zellkern

Für die Auswertung der ermittelten Transaktivierungsaktivitäten war es hilfreich, die Lokalisation der HIV-Tat-Varianten in der Zelle zu betrachten (Kap. 5.5.3.2). Eine Aktivität von HIV-Tat kann nur dann beobachtet werden, wenn es im Zellkern lokalisiert ist (Hauber et al., 1987). Wie bereits erwähnt (Kap. 6.2), beinhaltet die basische Sequenzdomäne von HIV-Tat auch die Kernlokalisationssequenz (NLS). Durch die Randomisierung von jeweils vier Resten dieser Sequenzdomäne wurde demnach auch die NLS verändert. Die Überprüfung der Lokalisation von HIV-Tat-Varianten gelang durch die Fusionierung des Tat-Proteins mit dem „Green Fluorescent Protein“ (GFP). GFP kann aufgrund seiner Größe in jedem Kompartiment der Zelle, mit Ausnahme des Nukleolus lokalisieren. Durch die Fusion mit dem Tat-Protein ist es dazu nicht mehr in der Lage und daher bestimmt nur der Fusionspartner die Lokalisation in der Zelle. Mit Hilfe von Konfokalmikroskopie ist es möglich, die Lokalisation der Tat-Varianten in der Zelle zu bestimmen. Die intakte NLS im Tat-wt führt dazu, dass das Tat-Protein nur im Zellkern aufzufinden ist (Abbildung 5-30). In der Regel ist die NLS eine kurze Abfolge von Aminosäuren, für die es kein einheitliches Konsensusmotiv gibt. Allerdings treten meist gehäuft Lysine auf, wobei auch eine glycinreiche NLS beschrieben wurde. Im einfachsten Fall einer NLS handelt es sich um einen Kluster an basischen Resten, dem eine Aminosäure vorausgestellt ist, welche der Ausbildung einer Helix entgegensteht. Die positiven Reste sorgen z.B. für die Bindung an Importine (Conti et al., 1998). Eine Zusammenfassung aller beschriebenen NLS findet sich bei Cokol et al., 2001. Anhand dieser Sequenzen wird deutlich, dass es ausreichend ist, wenn innerhalb einer fünf Aminosäurereste umfassenden Sequenz vier Arginine oder Lysine vorliegen.

Daher ist es nicht erstaunlich, dass mit Ausnahme von Tat-mt8bas und Tat-VPGW alle selektierten Tat-Varianten noch in der Lage sind, in den Kern transportiert zu werden. Der Transport erfolgt auf aktivem Weg. Tat-mt8bas, welches keinen basischen Reste mehr enthält, kann nicht in den Kern gelangen (Kap. 5.5.3.2). Die Varianten Tat-mt8bas und Tat-VPGW besitzen keine Transaktivierungsaktivität, was daher kommt, dass sie nicht im Kern lokalisiert sind. Interessant wäre die Frage, ob diese beiden Varianten das HIV-LTR transaktivieren können, wenn sie durch die Fusion mit einer heterologen NLS in den Kern transportiert

werden würden. Nach den vorliegenden Ergebnissen der *in vitro* Experimente und der Modellierung sollte dies möglich sein, da beide Tat-Varianten eine TAR-Bindungsaktivität in der Gegenwart von Cyclin T1 aufweisen. Eine spekulativer Erklärung dafür, dass Tat-VPGW nicht in den Zellkern transportiert wird, ist eventuell, dass die Anhäufung der hydrophoben Reste im Zusammenhang mit dem großen aromatischen Rest der Tryptophans eine Bindung an Importin verhindert. Der Transport von HIV-Tat-wt in den Zellkern erfolgt über Importin- β (Truant & Cullen, 1999). Die Zelle hat aber darüber hinaus noch die Möglichkeiten, einen Kernimport über RanGTP, Importin- α oder Transportin zu vermitteln.

Die *in vivo* Aktivität der Tat-Varianten korreliert mit der Lokalisation in der Zelle

Mit Ausnahme von Tat-C31S-GQGGC besitzen Tat-Varianten aus Selektionen ohne die Gegenwart von Cyclin T1 eine relativ geringe Transaktivierungsaktivität. *In vitro* ist bei diesen Varianten die Bildung eines Tat-TAR-Cyclin T1-Komplexes möglich (Abbildung 5-26). Dieser Komplex ist aber möglicherweise für die Bedingungen *in vivo* nicht optimal, so dass es nur zu einer geringen Transaktivierungsaktivität kommt. Insgesamt wird bei der Betrachtung aller Transaktivierungsaktivitäten der verschiedenen Tat-Varianten deutlich, dass die Aktivität stark von der Lokalisation in der Zelle abhängig ist (Tabelle 6-1). Eine geringe Aktivität wird in allen Fällen beobachtet, in denen die Variante nur zu einem geringem Anteil im Kern lokalisiert ist. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die Transaktivierungsaktivität von HIV-Tat nur im Zellkern ausgeübt werden kann.

Die Transaktivierungsaktivität von HIV-Tat ist unabhängig von der Bindung von Tat an TAR-RNA *in vitro*. So bindet z.B. die Variante Tat-GQCIR ohne die Gegenwart von Cyclin T1 nicht an TAR-RNA, besitzt aber die gleiche Aktivität wie Tat-wt. Die Bindungseigenschaften der Tat-Varianten auf die TAR-Bindung scheinen für die *in vivo* Aktivität irrelevant oder in allen Fällen doch ausreichend zu sein.

6.5 Identifizierung HIV-TAR-RNA bindender Peptide

Bei der Selektion der pAK-*tat*-Bibliotheken traten nur wenige basische Aminosäurereste auf. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die basischen Reste den Transport von HIV-Tat durch die *E.coli* Membran negativ beeinflussen und dadurch ein zusätzlicher Selektionsdruck geschaffen wurde. Unter Verwendung einer Ph.D.12-Phagenbibliothek wurden in Selektionen gegen HIV-TAR-RNA, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden, Peptide selektiert, die hochaffin an TAR-RNA binden (Kap. 5.6). In keinem der Selektionsversuche konnte ein einheitliches TAR-Bindungsmotiv gefunden werden. Dies liegt unter Umständen daran, dass die Oberfläche der TAR-RNA sehr groß ist und eine Vielzahl von Bindungsstellen für ein 12er Peptid möglich sind. In Selektion B waren die Bedingungen durch das Waschen

mit unspezifischer tRNA und Elution mit freier TAR-RNA so gewählt, dass man von einer sehr spezifischen Bindung des selektierten Peptids ausgehen konnte, während in Selektion A die Bedingungen so gewählt waren, dass nicht notwendigerweise auf hohe Spezifität, als vielmehr auf hohe Affinität des Peptides selektiert wurde. Die Selektionen C und D sollten zeigen, ob die Erhöhung der Waschschriffe Auswirkungen auf das Selektionsergebnis hat. Die Bedingungen für Selektion E waren so gewählt, dass durch die ersten Waschschriffe mit Kompetitor-RNA alle Phagen entfernt werden, die nur sehr unspezifisch und mit geringer Affinität an TAR-RNA binden. Anschließend wurde zunächst mit freier TAR-RNA eluiert. Auf diese Weise wurden Peptid-TAR-Komplexe mit einem sehr geringen K_{off} erhalten und die im Komplex gebundenen Peptide wurden abschließend mit Triethylamin eluiert.

Verschiedene Selektionsstrategien führen zu unterschiedlichen Präferenzen für bestimmte Aminosäurereste im selektierten Peptid

Die Gesamtheit aller selektierten Peptide aus den verschiedenen Selektionen wurde unter dem Aspekt betrachtet, ob eine Präferenz für Aminosäuren mit einer bestimmten Eigenschaft vorliegt. Bei der Betrachtung aller Selektionen fällt auf, dass weniger aromatische Aminosäuren in den Peptiden auftreten, je mehr geladene Reste vorkommen. Möglicherweise wird die Bindung entweder durch elektrostatische Wechselwirkungen der geladenen Aminosäuren vermittelt, oder durch van-der-Waals Kontakte der aromatischen Aminosäuren

Für die Selektion A, die unter vollkommen unspezifischen Bedingungen durchgeführt wurde, kam es zu einer Anhäufung von hydrophoben (Isoleucin, Leucin, Methionin und Prolin) und positiv geladenen (18 % Arginin und 5,2 % Lysin) Aminosäureresten. Die Bindung an die TAR-RNA erfolgte demnach hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen.

In keiner Selektion der Ph.D.12-Bibliothek konnte ein einheitliches Bindungsmotiv gefunden werden. Daher wurden aus den Selektionen A, B und E Peptide ausgewählt (Pep-A, Pep-B bzw. Pep-E). Es wurden Peptide dieser Selektionen gewählt, da die Selektionen B und E unter spezifischen, die Selektion A unter unspezifischen Bedingungen durchgeführt wurde. Diese Peptide wurden dahingehend untersucht, mit welcher Affinität und Spezifität sie an TAR-RNA binden.

Alle untersuchten Peptide binden mit hoher Affinität an RNA

Pep-A bindet sowohl an TAR-RNA, als auch an tRNA mit einem K_D von 0,9 nM. Mit Pep-A wurde ein Peptid gefunden, welches hochaffin an RNA bindet. Pep-B bindet mit einem K_D von 3,3 nM an TAR-RNA und mit 34,1 nM an tRNA. Die Bindung an TAR-RNA ist demnach um Faktor 10 stärker. Problematisch bei der Bestimmung des K_D mit Hilfe der Fluoreszenztitration ist die Tatsache, dass die Titrationskurve keinen optimalen hyperbolischen Kurvenverlauf aufweist, sondern eher einen zweiphasigen Übergang vermuten

lässt. Das deutet darauf hin, dass für das Peptid mindestens zwei unterschiedliche Bindungsstellen an der TAR-RNA vorliegen. Für Pep-E konnte mit der Durchführung einer Fluoreszenztitration kein für die Bindung an TAR-RNA bestimmt werden. Die Bindung an tRNA erfolgt mit einem K_D von 3,6 nM. Da bei den Titrations das Peptid in einer Konzentration von 10 nM vorgelegt wurde, ist es aber durchaus möglich, dass die Dissoziationskonstante noch kleiner ist. Das liegt daran, dass man in einem Bereich kleiner 10 nM in der Titration den Unterschied zwischen 1 nM und 0,1 nM nicht erkennen kann.

Pep-B und Pep-E binden spezifisch an TAR-RNA

Im NMR-Spektrum einer RNA sind die Signale der Iminprotonen der Basen eines Watson-Crick-Basenpaares leicht zu beobachten, da sie am Rand des Spektrums liegen und gut zugeordnet werden können. Durch die Bindung eines Peptides an die RNA kommt es zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz des Iminprotonensignals. Die Iminprotonensignale sind für die TAR-RNA zugeordnet (Metzger et al., 1997) und es konnten für die Peptide Pep-B und Pep-E die Basen bestimmt werden, die an der Bindung beteiligt sind. In Abbildung 6-2 ist anhand der Sekundärstruktur von HIV-TAR-RNA dargestellt, welche Basen an der Bindung der Peptide beteiligt sind.

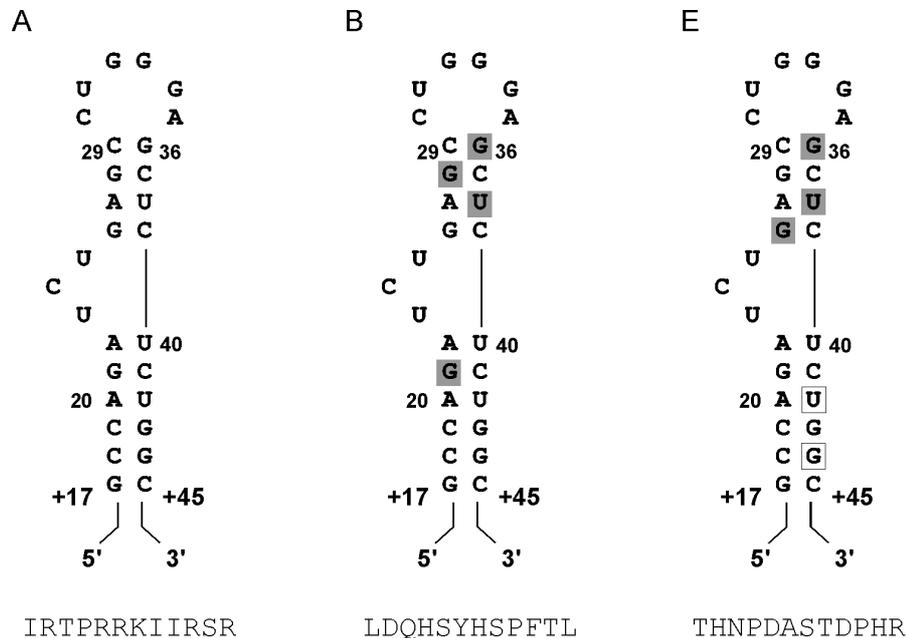


Abbildung 6-2: Beteiligung der Basen der TAR-RNA an der Bindung der Peptide. Gezeigt ist das Ergebnis der NMR-Titrationsexperimente. In der Sekundärstruktur der TAR-RNA sind die an der Bindung beteiligten Basen grau unterlegt. (A) Pep-A, (B) Pep-B, (E) Pep-E. Bei der Bindung von Pep-E ist zusätzlich entweder U42 oder G44 (eingrahmt) an der Bindung beteiligt. Alle Peptide waren am C-Terminus über ein Lysin mit Fluorescein markiert.

Die Bindung von Pep-A an HIV-TAR-RNA erfolgt nicht an einem definierten Bindungsort. Die Iminoprotonensignale sind nach der Zugabe des Peptids nicht mehr distinkt. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das Peptid an sehr vielen Stellen an die TAR-RNA bindet und dadurch viele unterschiedliche Populationen des Pep-A-TAR-Komplexes vorliegen. Daher kommt es zu vielen verschiedenen Signalen, die sich gegenseitig zu nahezu Null herausmitteln. Dies lässt vermuten, dass Pep-A aufgrund elektrostatischer Bindung an das Phosphatrückgrat der RNA selektiert wurde. Das Peptid hat einen stark basischen Charakter (sechs von 12 Aminosäureresten sind ein Arginin oder Lysin). Die Bindung ist daher zu einem großen Teil auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Resten des Peptides und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat zurückzuführen. Dies erklärt auch, dass Pep-A sowohl an TAR-RNA als auch an tRNA mit dem gleichen niedrigem K_D bindet. Die gehäufte Anzahl an basischen Resten führt zu einer hohen Affinität der Bindung, aber nicht zu einer hohen Spezifität.

Im Gegensatz dazu erkennt man für Pep-B anhand der Spektren der NMR-Titration einen definierten Bindungsort wobei deutlich wird, dass die Basen G21, G28, G36 und U38 in die Bindung involviert sind. Diese Bindung wird eventuell durch die hohe Anzahl an aromatischen Resten (zwei Histidine, jeweils ein Tyrosin und Phenylalanin) innerhalb der Peptidsequenz vermittelt. Ebenso spezifisch ist die Wechselwirkung der TAR-RNA mit Pep-E, an der die Basen G26, G36, U38 und U42 oder G44 beteiligt sind. Allerdings kommt es in diesem Fall auch durch die Zugabe eines 8-fachen Überschusses von Pep-E im Verhältnis zur TAR-RNA nur zu Verschiebungen der Iminoprotonen von 0,01 bis 0,02 ppm.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch eine spezifische Selektionsstrategie auch spezifisch bindende Peptide selektiert werden. Dabei scheint die Bindung an die TAR-RNA weniger auf elektrostatische Wechselwirkungen, als auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen zu sein.

Die Selektion spezifischer RNA-bindender Peptide aus einer Ph.D.-15 Peptidbibliothek konnte für die Anticodonregion der tRNA^{Phe} aus Hefe nachgewiesen werden. Dabei wurde die Peptidbibliothek auf die Bindung an die Anticodonregion der tRNA^{Phe}, die mit ihren *in vivo* vorkommenden Modifikationen versehen war, selektiert. Es wurde ein Peptid angereichert, das durch 40 % aller sequenzierten Klone kodiert wurde. Für dieses Peptid konnte eine spezifische Bindung an tRNA^{Phe} mit einem K_D von 1,3 μM nachgewiesen werden (Agris et al., 1999). Die Spezifität dieser Bindung ist hauptsächlich auf die Basenmodifikationen der tRNA^{Phe} zurückzuführen. Die Bindung des Peptids an unmodifizierte tRNA^{Phe} bindet nur noch mit einem K_D von 70 μM .

Im Fall der Selektion der Ph.D.12-Bibliothek gegen HIV-TAR lag die RNA ohne Modifikationen vor, so dass die Spezifität der Bindung einzig auf Wechselwirkungen mit den Basen beruht.

Das Selektionsergebnis der Ph.D.12-Peptidbibliothek zeigt auch, dass Peptide mit einer hohen Anzahl an geladenen Resten durch die Bakterienmembran transportiert werden können und somit keinen Nachteil gegenüber anderen Varianten besitzen. Unter den gewählten, unspezifischen Bedingungen (Selektion A) war es möglich, Peptide zu selektieren, die in der Sequenz bis zu 50 % basische Reste aufwiesen. Das bedeutet für die Selektionen der pAK-*tat*-random-Bibliotheken, dass die geringe Anzahl an basischen Aminosäuren nicht auf einen entgegengesetzten Selektionsdruck zurückzuführen ist. Unter den gegebenen Bedingungen konnten somit Tat-Varianten einzig aufgrund ihrer Affinität und Spezifität an TAR-RNA bzw. auf die Bildung eines Komplexes aus Tat, TAR-RNA und Cyclin T1 selektiert werden. Diese Bindung konnte in Gelretardationsexperimenten bestätigt werden.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte für das lentivirale Transaktivatorprotein HIV-1-Tat ein ternäres Phagen-Display-System etabliert werden.

Die Bindung von phagenpräsentiertem HIV-Tat an HIV-TAR-RNA erfolgt im Phagen-Display nur mit geringer Affinität. Durch die Erweiterung des Tat-TAR-Phagen-Displays mit dem zellulären Kofaktor Cyclin T1 konnte die Affinität und Spezifität der Bindung von HIV-Tat an HIV-TAR-RNA gesteigert werden. Somit konnte zum ersten Mal der *in vitro* und *in vivo* dokumentierte Einfluss eines Kofaktors in einem Phagen-Display-System reproduziert werden.

Bereits durch erste funktionelle Tests des ternären Phagen-Display-Systems konnte gezeigt werden, dass der Verlust der basischen Aminosäuren der basischen Sequenzdomäne von HIV-Tat keine negative Auswirkung auf die Wechselwirkung zwischen Cyclin T1 und HIV-Tat hat.

Für die weitere Untersuchung der Rolle der Aminosäuren der basischen Sequenzdomäne wurden voneinander unabhängige Tat-random-Bibliotheken konstruiert, in denen die Aminosäurepositionen R49, K50, K51, R52 bzw. die Aminosäurepositionen R53, R55, R56, R57 vollständig randomisiert wurden. Zusätzlich wurde eine Tat-C31S-random-Bibliothek basierend auf der Mutante Tat-C31S konstruiert, in der die Randomisierung an den Positionen R53, R55, R56, R57 erfolgte. Die Bibliotheken erwiesen sich mit einer Anzahl an unabhängigen Klonen zwischen $1,1 \times 10^6$ und $1,5 \times 10^6$ als ausreichend divers für eine Selektion.

Das Selektionssystem ermöglicht die Anreicherung von Tat-Varianten, die tatsächlich unter den gegebenen Selektionsbedingungen d.h. in Anwesenheit oder Abwesenheit von Cyclin T1 an TAR-RNA binden. Tat-wt wurde in keiner der Selektionen angereichert. Ebenso wurde keine Präferenz für basische Aminosäuren erhalten. Sie scheinen für die Bindung von HIV-Tat an TAR-RNA nicht notwendig zu sein. Alle selektierten Tat-Varianten besitzen die Fähigkeit, einen ternären Tat-TAR-Cyclin T1-Komplex auszubilden.

Alle charakterisierten Tat-Varianten besitzen *in vivo* Transaktivierungsaktivität, die mit der Lokalisation der Tat-Variante in der Zelle korreliert ist. Tat-Varianten, die ausschließlich im Kern lokalisieren, weisen die größte Aktivität auf, während Tat-Varianten, die nur in geringem Maß in die Zelle gelangen auch nur eine geringe Aktivität aufweisen.

Die Anhäufung von Argininen und Lysinen innerhalb eines Peptides übt keinen entgegengesetzten Selektionsdruck aus. Dies konnte durch die Selektion einer Ph.D.12-Peptidbibliothek nachgewiesen werden. Unter verschiedenen Selektionsbedingungen konnten Peptide selektiert werden, die mit verschiedenen Affinitäten und Spezifitäten TAR-RNA

binden. Unter unspezifischen Bedingungen konnte ein Peptid mit einer großen Anzahl an basischen Aminosäuren gefunden werden, welches hochaffin aber unspezifisch an TAR-RNA bindet. Im Gegensatz dazu wurden unter spezifischen Bedingungen Peptide gefunden, die mit hoher Affinität spezifisch an TAR-RNA binden.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein ternäres Phagen-Display-System für die Untersuchung von Protein-RNA Wechselwirkungen genutzt. Damit gelang es, Aufschluss über die Bedeutung der basischen Sequenzdomäne von HIV-1-Tat für die Bindung an TAR RNA zu erhalten.

8 Summary

In the present work a ternary phage display system suitable for the lentiviral transactivating protein Tat of HIV-1 was established.

Binding of phage displayed HIV-Tat to TAR RNA results only in low affinity. The Tat phage display system was upgraded with the cellular cofactor cyclin T1 which increases the affinity and specificity of Tat-TAR interaction. Thus, it was the first time that the *in vitro* and *in vivo* described influence of a cofactor was imitated by a phage display system.

Functional studies of the ternary phage display system have already shown, that removal of all basic residues of the basic sequence domain of HIV-Tat does not negatively effect the Tat-cyclin T1 interaction.

For further studies to investigate the role of amino acid residues of the basic sequence domain independent Tat-random libraries were constructed. Either sequence positions R49, K50, K51, R52 or R53, R55, R56, R57 were completely randomized. Besides a Tat-C31S-random library based on a Tat-C31S mutant was constructed in which the sequence positions R53, R55, R56, R56 were completely randomized. Libraries containing a number of $1,1 \times 10^6$ and $1,5 \times 10^6$ independent clones were sufficient for selection.

The selection system makes the enrichment of Tat-variants possible, which are actually able to bind TAR RNA under the given selection conditions which means in the presence or absence of cyclin T1. No selection procedure leads to the enrichment of Tat-wt, just as there were no preference for basic residues. The basic residues seems not to be important for binding of HIV-Tat to TAR RNA. All selected Tat-variants were able to form a ternary complex existing of Tat, TAR and cyclin T1.

All of the characterized Tat-variants have *in vivo* transactivating activity, which is connected with the localisation of the corresponding Tat-variant. Highest activity was found for Tat-variants that localise only in the nucleus, whereas Tat-variants with low activity get only to a slight portion into the nucleus.

Accumulation of arginine and lysine within a peptide does not lead to a opposite selection pressure. This was shown by selection of a Ph.D.12-peptide library. With different selection conditions it was able to select peptides that binds with different affinity and specificity to TAR RNA. Specific conditions leads to a peptide with a high number of basic residues which bind with high affinity but no specificity to TAR RNA. In contrast, specific conditions leads to peptides they bind with high affinity and specificity to TAR RNA.

In the present work it was the first time for using a ternary phage display system to investigate protein-RNA interactions. With this system it was possible to obtain information about the role of the basic sequenc domain of HIV-Tat for the binding to TAR RNA.

9 Abkürzungsverzeichnis

Aa	Aminosäure
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARM	<i>arginine rich motif</i>
Bio	Biotin
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>Cfu</i>	<i>colony forming unit</i>
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
Ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GFP	grünes Fluoreszenz-Protein
Gp	Genprodukt
GST	Glutathion-S-Transferase
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus type 1</i>
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
JDV	<i>jembrana disease virus</i>
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
Kb	1000 Basenpaare
K_D	Dissoziationskonstante
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MCS	multiple Klonierungsstelle

mRNA	Boten-RNA
NLS	<i>nucleus leading sequence</i> , Kernlokalisationssequenz
NMR	Magnetische Kernspinresonanz
Nt	Nukleotid
NTP	Nukleosid-5'-Triphosphat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>plaque forming unit</i>
Rev	<i>Regulator of virion expression</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen/Minute
RRE	<i>Rev responsive element</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNP	<i>small ribonucleoprotein</i>
TAR	<i>trans-activation responsive element</i>
Tat	<i>trans-activator of transcription</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Einheit
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultravioletter Spektralbereich
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid

10 Literaturverzeichnis

- Aboul ela, F., Karn, J. & Varani, G.** (1995). The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein. *J. Mol. Biol.* **253**:313-32.
- Agris, P. F., Marchbank, M. T., Newman, W., Guenther, R., Ingram, P., Swallow, J., Mucha, P., Szyk, A., Rekowski, P., Peletskaya, E. & Deutscher, S. L.** (1999). Experimental models of protein-RNA interaction: isolation and analysis of tRNA (Phe) and U1snRNA-binding peptides from bacteriophage display libraries. *J. Protein. Chem.* **18**:425-435.
- Aldovini, A. & Young, R. A.** (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* **64**:1920-1926.
- Babitzke, P., Stults, J. T., Shire, S. J. & Yanofsky, C.** (1994). TRAP, the trp RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*, is a multisubunit complex that appears to recognize G/UAG repeats in the trpEDCFBA and trpG transcripts. *J. Biol. Chem.* **269**:16597-604.
- Barbas, C. F., 3rd, Kang, A. S., Lerner, R. A. & Benkovic, S. J.** (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:7978-7982.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, T., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezin-Brun, F., Rouzioux, C., Rosenbaum, W. & Montagnier, L.** (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* **220**:868.
- Battiste, J. L., Mao, H., Rao, N. S., Tan, R., Muhandiram, D. R., Kay, L. E., Frankel, A. D. & Williamson, J. R.** (1996). Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex. *Science.* **273**:1547-51.
- Bayer, P., Kraft, M., Ejchart, A., Westendorp, M., Frank, R. & Rösch, P.** (1995). Structural studies of HIV-1 Tat protein. *J. Mol. Biol.* **247**:529-35.
- Biolabs, N. E.** Phage Display Peptide Library Kit. Instruction Manual 2.7. .
- Boder, E. T. & Wittrup, K. D.** (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotech.* **15**:553-557.
- Brake, D. A., Debouck, C. & Biesecker, G.** (1990). Identification of an Arg-Gly-Asp (RGD) cell adhesion site in human immunodeficiency virus type 1 transactivation protein, tat. *J. Cell. Biol.* **111**:1275-81.

- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987). *Biotechniques*. **5**:376-379.
- Calnan, B. J., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D. & Frankel, A. D.** (1991a). Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork [published erratum appears in *Science* 1992 Feb 7;255(5045):665]. *Science*. **252**:1167-71.
- Calnan, B. J., Biancalana, S., Hudson, D. & Frankel, A. D.** (1991b). Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev*. **5**:201-10.
- Carroll, R., Martarano, L. & Derse, D.** (1991). Identification of lentivirus tat functional domains through generation of equine infectious anemia virus/human immunodeficiency virus type 1 tat gene chimeras. *J. Virol*. **65**:3460-7.
- Charbit, A., Sobezak, E., Michel, M. L., Molla, A., Tiollias, P. & Hofung, M.** (1987). Presentation of two epitopes of the pre-S2 region of Hepatitis B virus on live recombinant bacteria. *J. Immunol*. **139**:1658-1662.
- Choo, Y. & Klug, A.** (1994a). Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **91**:11168-72.
- Choo, Y. & Klug, A.** (1994b). Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: Selection of randomized fingers displayed on phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**:11163-11167.
- Churcher, M. J., Lamont, C., Hamy, F., Dingwall, C., Green, S. M., Lowe, A. D., Butler, J. G., Gait, M. J. & Karn, J.** (1993). High affinity binding of TAR RNA by the human immunodeficiency virus type-1 tat protein requires base-pairs in the RNA stem and amino acid residues flanking the basic region. *J. Mol. Biol*. **230**:90-110.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. & Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **69**:2210-2214.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. & Kuriyan, J.** (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell*. **94**:193-204.
- Cordingley, M. G., LaFemina, R. L., Callahan, P. L., Condra, J. H., Sardana, V. V., Graham, D. J., Nguyen, T. M., LeGrow, K., Gotlib, L., Schlabach, A. J. & et al.** (1990). Sequence-specific interaction of Tat protein and Tat peptides with the

- transactivation-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**:8985-9.
- Crissman, J. W. & Smith, G. P.** (1984). Gene 3 protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology.* **132**:445-455.
- Cull, M. G., Miller, J. F. & Schatz, P. J.** (1992). Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**:1865-1869.
- Cullen, B. R.** (1986). Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell.* **46**:973-82.
- Cullen, B. R.** (1990). The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell.* **63**:655-7.
- Cullen, B. R.** 1993. Human Retroviruses. IRL Press, Oxford.
- Danner, S. & Belasco, J. G.** (2001). T7 phage display: A novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:12954-12959.
- Dayton, A. I., Sodroski, J. G., Rosen, C. A., Goh, W. C. & Haseltine, W. A.** (1986). The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell.* **44**:941-947.
- Delling, U., Roy, S., Sumner Smith, M., Barnett, R., Reid, L., Rosen, C. A. & Sonenberg, N.** (1991). The number of positively charged amino acids in the basic domain of Tat is critical for trans-activation and complex formation with TAR RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**:6234-8.
- Derse, D., Carvalho, M., Carroll, R. & Peterlin, B. M.** (1991). A minimal lentivirus Tat. *J. Virol.* **65**:7012-5.
- Devlin, J. J., Panganiban, L. C. & Devlin, P. E.** (1990). Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules. *Science.* **249**:404-406.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M. & Skinner, M. A.** (1990). HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J.* **9**:4145-53.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M., Skinner, M. A. & Valerio, R.** (1989). Human immunodeficiency virus 1

- tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **86**:6925-9.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**:6127-6145.
- Draper, D. E.** (1999a). Themes in RNA-protein recognition. *J. Mol Biol.* **293**:255-270.
- Draper, D. E. & Reynaldo, L. P.** (1999b). RNA binding strategies of ribosomal proteins. *Nucl. Acids. Res.* **27**:381-388.
- Emerman, M. & Malim, M. H.** (1998). HIV-1 regulatory/ accessory genes: Keys to unraveling viral and host cell biology. *Science.* **280**:1880-1884.
- Endo, S., Kubota, S., Siomi, H., Adachi, A., Oroszlan, S., Maki, M. & Hatanaka, M.** (1989). A region of basic amino-acid cluster in HIV-1 Tat protein is essential for trans-acting activity and nucleolar localization. *Virus Genes.* **3**:99-110.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B. & Barsoum, J.** (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**:664-8.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Ringold, G. M. & Danielsen, M.** (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:7413-7417.
- Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R. & Cesareni, G.** (1991). Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* **222**:301-310.
- Fisher, A. G., Feinberg, M. B., Josephs, S. B., Harper, M. E., Marselle, L. M., Reyes, G., Gonda, M. A., Aldovini, A., Debouck, C., Gallo, R. C. & Wong-Stahl, F.** (1986). The trans-activator gene of the HTLV III is essential for virus replication. *Nature.* **320**:367-371.
- Frankel, A. D., Brecht, D. S. & Pabo, C. O.** (1988). Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science.* **240**:70-3.
- Frankel, A. D. & Pabo, C. O.** (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* **55**:1189-93.
- Friesen, W. J. & Darby, M. K.** (1997). Phage display of RNA binding zinc fingers from transcription factor IIIA. *J. Biol. Chem.* **272**:10994-7.
- Friesen, W. J. & Darby, M. K.** (1998). Specific RNA binding proteins constricted from zinc fingers. *Nat. Struct. Biol.* **5**:543-546.
- Friesen, W. J. & Darby, M. K.** (2001). Specific RNA binding by a single C₂H₂ zinc finger. *J. Biol. Chem.* **276**:1968-1973.

- Gait, M. J. & Karn, J.** (1993). RNA recognition by the human immunodeficiency virus Tat and Rev proteins. *Trends Biochem. Sci.* **18**:255-9.
- Garber, M. E., Wei, P., KewalRamani, V. N., Mayall, T. P., Herrmann, C. H., Rice, A. P., Littman, D. R. & Jones, K. A.** (1998). The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes Dev.* **12**:3512-27.
- Garcia, J. A., Harrich, D., Pearson, L., Mitsuyasu, R. & Gaynor, R. B.** (1988). Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J.* **7**:3143-7.
- Garcia, J. A., Harrich, D., Soultanakis, E., Wu, F., Mitsuyasu, R. & Gaynor, R. B.** (1989). Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. *EMBO J.* **8**:765-78.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem.* **182**:319-326.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C. & Nairn, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA fragments of adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**:59-74.
- Graumann, P. L. & Marahiel, M. A.** (1998). **A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain.** *Trends Biochem. Sci.* **23**:286-290.
- Gray, C. W., Brown, R. S. & Marvin, D. A.** (1981). Adsorption complex of filamentous fd virus. *J. Mol. Biol.* **146**:621-627.
- Greenblatt, J., Nodwell, J. R. & Mason, S. W.** (1993). Transcriptional antitermination. *Nature.* **364**:401-6.
- Grodberg, J. & Dunn, J. J.** (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**:1245-1253.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. & Altman, S.** (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell.* **35**:849.
- Gusarov, I. & nudler, E.** (2001). Control of Intrinsic Transcription Termination by N and NusA: The Basic Mechanisms. *Cell.* **107**:437-449.
- Hanes, J. & Pluckthun, A.** (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**:4937-42.
- Hauber, J. & Cullen, B. R.** (1988). Mutational analysis of the trans-activation-responsive region of the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat. *J. Virol.* **62**:673-9.

- Hauber, J., Malim, M. H. & Cullen, B. R.** (1989). Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* **63**:1181-7.
- Hauber, J., Perkins, A., Heimer, E. P. & Cullen, B. R.** (1987). Trans-activation of human immunodeficiency virus gene expression is mediated by nuclear events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84**:6364-8.
- Hayman, M., Arbuthnott, G., Harkiss, G., Brace, H., Filippi, P., Philippon, V., Thomson, D., Vigne, R. & Wright, A.** (1993). Neurotoxicity of peptide analogues of the transactivating protein tat from Maedi-Visna virus and human immunodeficiency virus. *Neuroscience.* **53**:1-6.
- Helland, D. E., Welles, J. L., Caputo, A. & Haseltine, W. A.** (1991). Transcellular transactivation by the human immunodeficiency virus type 1 tat protein. *J. Virol.* **65**:4547-9.
- Henkin, T. M.** (2000). Transcription termination control in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:149-153.
- Herrmann, C. H. & Rice, A. P.** (1993). Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase. *Virology.* **197**:601-8.
- Herrmann, C. H. & Rice, A. P.** (1995). Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J. Virol.* **69**:1612-20.
- Hill, W. E.** 1990. The Ribosom: Structure, Function and Evolution. American Society of Microbiology, Washington DC.
- Hoffmann, S. & Willbold, D.** (1997). A selection system to study protein-RNA interactions: Functional display of HIV-1Tat protein on filamentous bacteriophage M13. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **235**:806-811.
- Ivanov, D., Kwak, Y. T., Nee, E., Guo, J., Garcia-Martinez, L. F. & Gaynor, R. B.** (1999). Cyclin T1 domains involved in complex formation with Tat and TAR RNA are critical for tat-activation. *J. Mol. Biol.* **288**:41-56.
- Jacob, F. & Monod, J.** (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**:318-356.
- Jeang, K. T.** (1998). Tat, Tat-associated kinase, and transcription. *J. Biomed. Sci.* **5**:24-7.
- Jessee, J.** (1986). New subcloning efficiency competent cells:>10⁶ transformants/μg. *Focus.* **8**/4:9-10.

- Jessen, T. H., Oubridge, C., Teo, C. H., Pritchard, C. & Nagai, K.** (1991). Identification of molecular contacts between the U1A small nuclear ribonucleoprotein and U1 RNA. *EMBO J.* **10**:3447-3456.
- Jonas, G., Hoffmann, S. & Willbold, D.** (2001). Binding of Phage-displayed HIV-1 Tat to TAR RNA in the Presence of Cyclin T1. *J. Biomed. Sci.* **8**:430-436.
- Jones, K. A.** (1997). Taking a new TAK on tat transactivation [comment]. *Genes Dev.* **11**:2593-9.
- Jones, K. A. & Peterlin, B. M.** (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem.* **63**:717-43.
- Kamine, J., Loewenstein, P. & Green, M.** (1991). Mapping of HIV-1 Tat protein sequences required for binding to Tar RNA. *Virology.* **182**:570-7.
- Kao, S. Y., Calman, A. F., Luciw, P. A. & Peterlin, B. M.** (1987). Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature.* **330**:489-93.
- Karn, J., Gait, M. J., Churcher, M. J., Mann, D. A., Mikaélian, I. & Pritchard, C.** 1994. Control of human immunodeficiency virus gene expression by the RNA-binding proteins tat and rev. *In* RNA-Protein Interactions. K. Nagai and I. W. Mattaj, editors. Oxford University Press, Oxford. 192-220.
- Kashanchi, F., Piras, G., Radonovich, M. F., Duvall, J. F., Fattaey, A., Chiang, C. M., Roeder, R. G. & Brady, J. N.** (1994). Direct interaction of human TFIID with the HIV-1 transactivator tat. *Nature.* **367**:295-9.
- Katsamba, P. S., Myszka, D. G. & Laird-Offringa, I.** (2001). Two functionally distinct steps mediate high affinity binding of U1A protein to U1 hairpin II RNA. *J. Biol. Chem.* **276**:21476-81.
- Katz, B. A.** (1997). Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by phage display. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**:27-45.
- Kay, B. K.** (1994). Biologically displayed random peptides as reagents in mapping protein-protein interactions. *Perspectives in Drug Discovery and Design.* **2**:251-268.
- Keen, N. J., Churcher, M. J. & Karn, J.** (1997). Transfer of Tat and release of TAR RNA during the activation of the human immunodeficiency virus type-1 transcription elongation complex. *EMBO J.* **16**:5260-5272.
- Kenan, D. J., Tsai, D. E. & Keene, J. D.** (1994). Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries. *Trends Biochem. Sci.* **19**:57-64.

- Kishchenko, G. P., Minenkova, O. O., Ilyichev, A. A., Gruzdev, A. D. & Petrenko, V. A.** (1991). Study on the structure of M13 phage virions containing chimeric B-protein molecules. *Molekularna Biologiya (Russ.)*. **25**:1497-1503.
- Koivunen, E., Wang, B. & Ruoslahti, E.** (1994). Isolation of a highly specific ligand for the alpha 5 beta 1 integrin from a phage display library. *J. Cell. Biol.* **124**:373-80.
- Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D. A. & Cheatham, T. E. r.** (2000). Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* **33**:889-897.
- Kraft, A., Lutz, C., Lingenhel, A., Grobner, P. & Piendl, W.** (1999). Control of ribosomal protein L1 synthesis in mesophilic and thermophilic archaea. *Genetics*. **152**.
- Krebber, A., Burmester, J. & Pluckthun, A.** (1996a). Inclusion of an upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p. *Gene*:71-74.
- Krebber, A., Burmester, J. & Plückthun, A.** (1996b). Inclusion of upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p. *Gene*. **178**:71-74.
- Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D., Krebber, A., Ge, L. & Pluckthun, A.** (1997). Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel in vivo selection for protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.*. **268**:607-18.
- Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D. & Pluckthun, A.** (1995). Co-selection of cognate antibody-antigen pairs by selectively-infective phages. *FEBS-Letters*. **377**:227-231.
- Kuhn, A.** (1995). Major coat proteins of bacteriophage Pf3 and M13 as model systems for Sec-independent protein transport. *FEMS Microbiol. Reviews*. **17**:185-190.
- Kuppuswamy, M., Subramanian, T., Srinivasan, A. & Chinnadurai, G.** (1989). Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucl. Acids Res.* **17**:3551-61.
- Kwak, Y. T., Ivanov, D., Guo, J., Nee, E. & Gaynor, R. B.** (1999). Role of the human and murine cyclin T proteins in regulating HIV-1 tat-activation. *J. Mol. Biol.* **288**:57-69.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.
- Laird Offringa, I. A. & Belasco, J. G.** (1995). Analysis of RNA-binding proteins by in vitro genetic selection: identification of an amino acid residue important for locking U1A onto its RNA target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **92**:11859-63.

- Laird-Offringa, I. A. & Belasco, J. G.** (1998). RNA-binding proteins tamed. *Nat. Struct. Biol.* **5**:665-668.
- Landt, O., Grunert, H.-P. & Hahn, U.** (1990). A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene.* **96**:125-128.
- Legault, P., Li, J., Mogridge, J., Kay, L. E. & Greenblatt, J.** (1998). NMR structure of the bacteriophage λ N peptide/boxB RNA complex: recognition of a GNRA fold by an arginine rich motif. *Cell.* **93**:189-299.
- Lever, A. M. L., Göttliger, H. G., Haseltine, W. A. & Sodroski, J. G.** (1989). Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* **63**.
- Levy, J. A.** (1993). Features of human immunodeficiency virus infection and disease. *Pediatr. Res.* **33**:S63-9.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. & Wlodawer, A.** (1998). The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of gp3. *Nature.* **5**:140-147.
- Luzzago, A., Felici, F., Tramontano, A., Pessi, A. & Cortese, R.** (1993). Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene.* **128**:51-57.
- Mann, R. & Baltimore, D.** (1985). Varying the position of a retrovirus packaging sequence results in the encapsidation of both unspliced and spliced RNA. *J. Virol.* **54**:401-407.
- Markley, J. L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C. W., Kaptein, R., Sykes, B. D., Wright, P. E. & Wuthrich, K.** (1998). Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids--IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the standardization of data bases of protein and nucleic acid structures determined by NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **256**:1-15.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. & Winter, G.** (1992). Molecular evolution of proteins on filamentous phage mimicking the strategy of the immune system. *J. Biol. Chem.* **267**:16007-16010.
- Martin, A., Sieber, V. & Schmid, F. X.** (2001). *In vitro* selection of highly stabilized protein variants with optimized surface. *J. Mol. Biol.* **309**:717-726.
- Marvin, D. A., Hale, R. D., Nave, C. & Citterich, M. H.** (1994). Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages fF (fd, f1, M13), If I and Ike. *J. Mol. Biol.* **232**.
- Mattaj, I. W.** (1993). RNA recognition: A family matter? *Cell.* **73**:837-840.

- Mattheakis, L. C., bhatt, R. R. & Dower, W. J.** (1994). An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**:9022-9026.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J.** (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* **348**:552-554.
- McConnell, S. J., Kendall, M. L., Reilly, T. M. & Hoess, R. H.** (1994). Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. *Gene.* **151**:115-8.
- Metzger, A. U., Bayer, P., Willbold, D., Hoffmann, S., Frank, R. W., Goody, R. S. & Rösch, P.** (1997). The interaction of HIV-1 Tat(32-72) with its target RNA: a fluorescence and nuclear magnetic resonance study. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **241**:31-36.
- Modrow, S. & Falke, D.** 1997. Retroviren. *In* Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 290-331.
- Moras, D.** (1992). Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**:138-142.
- Motti, C., Nuzzo, M., Meola, A., Galfre, G., Felici, F., Cortese, R., Nicosia, A. & Monaci, P.** (1994). Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene.* **146**:191-8.
- Mucha, P., Szyk, A., Rekowski, P., Weiss, P. A. & Agris, P. F.** (2001). Anticodon domain methylated nucleosides of yeast tRNA^{Phe} are significant recognition determinants in the binding of a phage display selected peptide. *Biochem.* **40**.
- Muesing, M. A., Smith, D. H. & Capon, D. J.** (1987). Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell.* **48**:691-701.
- Nagai, K.** (1996). RNA-Protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**:53-61.
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T. H., Li, J. & Evans, P. R.** (1990). Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoproteinA. *Nature.* **348**:515-520.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A.** (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science.* **289**:920-930.
- Nomura, M., Gourse, R. & Baughman, G.** (1984). Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu. Rev. Biochem.* **53**:75-117.
- Oubridge, C., Ito, N., Evans, P. R., Teo, C.-H. & Nagai, K.** (1994). Crystal structure at 1,92 Å resolution of the RNA-binding domain of the RNA-binding domain of the U1A splicosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature.* **372**:432-438.
- Parmley, S. F. & Smith, G. P.** (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene.* **73**:305-318.

- Pavletich, N. P. & Pabo, C. O.** (1991). zinc-finger-DNA recognition: Crystal structure of Zif268-DNA complex at 2,1 Å. *Science*. **252**:809-817.
- Philippon, V., Vellutini, C., Gambarelli, D., Harkiss, G., Arbuthnott, G., Metzger, D., Roubin, R. & Filippi, P.** (1994). The basic domain of the lentiviral Tat protein is responsible for damages in mouse brain: involvement of cytokines. *Virology*. **205**:519-29.
- Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V.** (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR*. **2**:661-665.
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. & Gallo, R. C.** (1984). Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. **224**:497.
- Ptashne, M.** (1967). Specific binding of the lambda phage repressor to lambda DNA. *Nature*. **214**:232-234.
- Puglisi, J. D., Chen, L., Blanchard, S. & Frankel, A. D.** (1995). Solution structure of a bovine immunodeficiency virus Tat-TAR peptide-RNA complex. *Science*. **270**:1200-1203.
- Ramakrishnan, V. & White, S. W.** (1998). Ribosomal Protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome. *Trends Biochem. Sci.* **23**:208-212.
- Ren, Z. J., Lewis, G. K., Wingfield, P. T., Locke, E. G., Steven, A. C. & Black, L. W.** (1996). Phage display of intact domains at high copy number: a system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4. *Protein Sci.* **5**:1833-43.
- Robertson, H. D. & Mathews, M. B.** (1996). The regulation of the protein kinase PKR by RNA. *Biochimie*. **78**:909-914.
- Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W. A. & Rosen, C. A.** (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* **63**:1-8.
- Rutberg, N.** (1997). Antitermination of transcription of catabolic operons. *Mol. Microbiol.* **23**:413-421.
- Sachs, A. & Wahle, E.** (1993). Poly(A)tail metabolism and function in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **26**:22955-22958.
- Sadaie, M. R., Benter, T. & Wong Staal, F.** (1988a). Site-directed mutagenesis of two trans-regulatory genes (tat-III, trs) of HIV-1. *Science*. **239**:910-3.
- Sadaie, M. R., Rappaport, J., Benter, T., Josephs, S. F., Willis, R. & Wong Staal, F.** (1988b). Missense mutations in an infectious human immunodeficiency viral genome:

functional mapping of tat and identification of the rev splice acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**:9224-8.

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science.* **230**:1350-1354.
- Schärpf, M., Sticht, H., Schweimer, K., Boehm, M., Hoffmann, S., Rösch, P. & Rösch.** (2000). Antitermination in bacteriophage λ : the structure of the N36 peptide-boxB RNA complex. *Eur. J. Biochem.* **267**:2397-2408.
- Scherly, D., Boelens, W., Dathan, N. A., VanVenrooji, W. J. & Mattaj, I. W.** (1990). Major determinants of specificity of interaction between small nuclear ribonucleoproteins U1A and U1B and their cognate RNAs. *Nature.* **345**:502-506.
- Scott, J. K.** (1992). Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem. Sci.* **17**:241-245.
- Seewald, M. J., Metzger, A. U., Willbold, D., Rosch, P. & Sticht, H.** (1998). Structural model of the HIV-1 Tat(46-58)-TAR complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **16**:683-92.
- Sieber, V., Plückthun, A. & Schmid, F. X.** (1998). Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat. Biotech.* **16**:955-960.
- Siomi, H. & Dreyfuss, G.** (1997). RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**:345-353.
- Siomi, H., Shida, H., Maki, M. & Hatanaka, M.** (1990). Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J. Virol.* **64**:1803-7.
- Smith, C. A., Calabro, V. & Frankel, A. D.** (2000). An RNA-binding chameleon. *Mol. Cell.* **6**:1067-1076.
- Smith, G. P.** (1985). Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* **228**:1315-1317.
- Smith, G. P.** (1993). Surface display and peptide libraries. *Gene.* **128**:1-2.
- Sodroski, J., Patarca, R., Rosen, C. & Wong-Staal, F.** (1985a). Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science.* **229**:74.
- Sparks, A. B., Quilliam, L. A., Thorn, J. M., Der, C. J. & Kay, B. K.** (1994). Identification and characterisation of Src SH3 ligands from phage -displayed random peptide libraries. *J. Biol. Chem.* **269**:23853-23856.
- Sternberg, N. & Hoess, R. H.** (1995). Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage λ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**:1609-1613.

- Studier, W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorf, J. W.** (1990). Use of T7 RNA Polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**:60-89.
- Subramanian, T., C, D. S. E., Elangovan, B. & Chinnadurai, G.** (1994). The activation region of the Tat protein of human immunodeficiency virus type-1 functions in yeast. *Nucl. Acids Res.* **22**:1496-9.
- Tan, R. & Frankel, A. D.** (1995). Structural variety of arginine-rich RNA-binding peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**:5282-6.
- Tao, J. & Frankel, A. D.** (1992). Specific binding of arginine to TAR RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**:2723-6.
- Tao, J. & Frankel, A. D.** (1993). Electrostatic interactions modulate the RNA-binding and transactivation specificities of the human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus Tat proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90**:1571-5.
- Todaro, G. J., Habel, K. & Green, H.** (1965). Antigenic and cultural properties of cells doubly transformed by polyoma virus and SV40. *Virology.* **27**:179-185.
- Truant, R. & Cullen, B. R.** (1999). The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol. Cell. Biol.* **19**:1210-7.
- Tsai, D. E., Harper, D. S. & Keene, J. D.** (1991). U1-snRNP-A protein selects a ten nucleotide consensus sequence from a degenerate RNA pool presented in various structural contexts. *Nucl. Acids Res.* **19**:4931-4936.
- Tuerk, C. & Gold, L.** (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science.* **249**:505.
- van Gelder, C. W., Gunderson, S. I., Jansen, E. J., Boelens, W. C., Polycarpon Schwarz, M., Mattaj, I. W. & van Venrooji, W. J.** (1993). A complex secondary structure in U1A pre-mRNA that binds two molecules of U1A protein is required for regulation of polyadenylation. *EMBO J.* **12**:5191-5200.
- Van Gilst, M. R. & Von-Hippel, P. H.** (1997). Assembly of the N-dependent antitermination complex of Phage lambda: NusA and RNA bind independently to different unfolded domains of the N protein. *J. Mol. Biol.* **274**:160-173.
- Vives, E., Brodin, P. & Lebleu, B.** (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**:16010-16017.
- Vives, E., Charneau, P., van Rietschoten, J., Rochat, H. & Bahraoui, E.** (1994). Effects of the Tat basic domain on human immunodeficiency virus type 1 transactivation, using chemically synthesized Tat protein and Tat peptides. *J. Virol.* **68**:3343-53.

- Wahle, E. & Ruegsegger, U.** (1999). 3'-end processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**.
- Wang, W., Donini, O., Reyes, C. M. & Kollman, P. A.** (2001). Biomolecular simulations: recent developments in force fields, simulations of enzyme catalysis, protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid noncovalent interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**:211-243.
- Warner, J. R., Mitra, G., Schwindinger, W. F., Studeny, M. & Fried, H. M.** (1985). *Saccharomyces cerevisiae* coordinates accumulation of yeast ribosomal proteins by modulating mRNA splicing, translational initiation, and protein turnover. *Mol. Cell. Biol.* **5**:512-521.
- Watanabe, S. & Temin, H. M.** (1982). Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 5' long terminal repeat and the start of the gag gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:5986-5990.
- Weeks, B. S., Desai, K., Loewenstein, P. M., Klotman, M. E., Klotman, P. E., Green, M. & Kleinman, H. K.** (1993). Identification of a novel cell attachment domain in the HIV-1 Tat protein and its 90-kDa cell surface binding protein. *J. Biol. Chem.* **268**:5279-84.
- Weeks, K. M., Ampe, C., Schultz, S. C., Steitz, T. A. & Crothers, D. M.** (1990). Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science.* **249**:1281-5.
- Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H. & Jones, K. A.** (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell.* **92**:451-62.
- Wilson, D. S., Keefe, A. D. & Szostak, J. W.** (2001). The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **98**:3750-3755.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. & Hoogenboom, H. R.** (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:433-55.
- Wittekind, M., Görlach, M., Friedrichs, M., Dreyfuss, G. & Mueller, L.** (1992). ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR assignments and global folding pattern of the RNA-binding domain of the human hnRNP C proteins. *Biochem.* **31**:6254-6265.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R. & Noller, H. F.** (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* **47**:621-669.
- Ye, X., Kumar, R. A. & Patel, D. J.** (1995). Molecular recognition in the bovine immunodeficiency virus Tat peptide-TAR RNA complex. *Chem. Biol.* **2**:827-832.
- Zengel, J. M. & Lindahl, L.** (1994). Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**.

11 Anhang

11.1 Nukleinsäuresequenz von HIV-*tat*-wt(E/E)

```

TTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGCTCGAGCCGGTCGACCCGAACATCGAA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
AACAAATAATGAGCGCCGGGTCGGCCGGTACCGCGAGCTCGGCCAGCTGGGCCTGTAGCTT

L L L L A A Q P A M A L E P V D P N I E

CCGTGGAACCACCCCGGGTCTCAACCGAAAACCTGCTTGCAACCGTTGCCACTGCAAGAAA
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GGCACCTTGGTGGGGCCAGAGTTGGCTTTTGACGAACGTTGGCAACGGTGACGTTCTTT

P W N H P G S Q P K T A C N R C H C K K

TGCACGTACCACTGCCAAGTTTGCCTTTATCACTAAGGGCCTCGGAATTTCTTACGGTCGT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
ACGTGCATGGTGACGGTTCAAACGAAATAGTGATTCCC GGAGCCTTAAAGAATGCCAGCA

C S Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G R

AAGAAACGTCGTCAGCGTCGTCGTCCGTCTCAGGGTGGTCAAACATCAGGACCCGATC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TTCTTTGCAGCAGTCGCAGCAGCAGGCAGAGTCCCACCAGTTTGAGTAGTCTGGGCTAG

K K R R Q R R R P S Q G G Q T H Q D P I

CCGAAACAGGCCTCGGGGGCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCTTTGTCCGGAGCCCCCGG

P K Q A S G A

```

Abbildung 11-1: Die HIV-*tat*-Sequenz (Isolat Zaire 2) aus pAK-*tat*-wt(E/E). Die Nukleotidpositionen der Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Sfi*I und *Eco*O109I sind unterstrichen. Fettgedruckte Aminosäuren repräsentieren die HIV-*tat*-Sequenz, kursiv gedruckte Reste sind Bestandteil des pelB-Signalpeptids oder von Gp3.

11.2 Nukleinsäuresequenz von CyclinT272Δ

Für die Expression und Reinigung von CyclinT272Δ wurde das Plasmid pHis-hCycT1(272Δ) verwendet.

```

ATGGAGGGAGAGAGGAAGAACAACAACAAACGGTGGTATTTCACTCGAGAACAGCTGGAA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACCTCCCTCTCTCCTTCTTGTGTTGTTGTTGCCACCATAAAGTGAGCTCTTGTGCGACCT

M E G E R K N N N K R W Y F T R E Q L E -

AATAGCCCATCCCCTCGTTTTGGCGTGGACCCAGATAAAGAACTTTCTTATCGCCAGCAG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TTATCGGGTAGGGCAGCAAACCCGCACCTGGGTCTATTTCTTGAAAGAATAGCGGTGCGTC

N S P S R R F G V D P D K E L S Y R Q Q -

GCGGCCAATCTGCTTCAGGACATGGGGCAGCGTCTTAACGTCTCACAATTGACTATCAAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CGCCGGTTAGACGAAGTCCTGTACCCCGTCGCAGAATTGCAGAGTGTTAACTGATAGTTG

A A N L L Q D M G Q R L N V S Q L T I N -

ACTGCTATAGTATACATGCATCGATTCTACATGATTTCAGTCCTTCACACAGTTCCTGGA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TGACGATATCATATGTACGTAGCTAAGATGTACTAAGTCAGGAAGTGTGTCAAGGGACCT

T A I V Y M H R F Y M I Q S F T Q F P G -

AATTCGTGGCTCCAGCAGCCTTGTTTCTAGCAGCTAAAGTGGAGGAGCAGCCCAAAAAA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TTAAGACACCGAGGTCGTCGGAACAAAGATCGTCGATTTACCTCCTCGTCGGGTTTTTTT

N S V A P A A L F L A A K V E E Q P K K -

TTGGAACATGTCATCAAGGTAGCACATACTTGTCTCCATCCTCAGGAATCCCTTCCTGAT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
AACCTTGACAGTAGTTCATCGTGTATGAACAGAGGTAGGAGTCCTTAGGGAAGGACTA

L E H V I K V A H T C L H P Q E S L P D -

ACTAGAAGTGAGGCTTATTTGCAACAAGTTCAAGATCTGGTCATTTTAGAAAGCATAATT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TGATCTTCACTCCGAATAAACGTTGTTCAAGTTCTAGACCAGTAAAATCTTTTCGTATTAA

T R S E A Y L Q Q V Q D L V I L E S I I -

TTGCAGACTTTAGGCTTTGAACTAACAATTGATCACCCACATACTCATGTAGTAAAGTGC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
AACGTCTGAAATCCGAAACTTGATTGTTAACTAGTGGGTGTATGAGTACATCATTTTCAGC

L Q T L G F E L T I D H P H T H V V K C -

ACTCAACTTGTTTCGAGCAAGCAAGGACTTAGCACAGACTTCTTACTTCATGGCAACCAAC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TGAGTTGAACAAGCTCGTTCGTTCCCTGAATCGTGTCTGAAGAATGAAGTACCGTTGGTTG

T Q L V R A S K D L A Q T S Y F M A T N

```

```

AGCCTGCATTTGACCACATTTAGCCTGCAGTACACACCTCCTGTGGTGGCCTGTGTCTGC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TCGGACGTAAACTGGTGTAATCGGACGTCATGTGTGGAGGACACCACCGGACACAGACG

S L H L T T F S L Q Y T P P V V A C V C -

ATTCACCTGGCTTGCAAGTGGTCCAATTGGGAGATCCCAGTCTCAACTGACGGGAAGCAC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
TAAGTGGACCGAACGTTTACCAGGTTAACCTCTAGGGTCAGAGTTGACTGCCCTTCGTG

I H L A C K W S N W E I P V S T D G K H -

TGGTGGGAGTATGTTGACGCCACTGTGACCTTGGAACTTTTAGATGAACTGACACATGAG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
ACCACCTCATACTGCGGTGACACTGGAACCTTGAAAATCTACTTGACTGTGTACTC

W W E Y V D A T V T L E L L D E L T H E -

TTTCTACAGATTTTGGAGAAAACCTCCAACAGGCTCAAACGCATTTGGAATTGGAGGGCA
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
AAAGATGTCTAAAACCTCTTTTGAGGGTTGTCCGAGTTTGCCTAAACCTTAACCTCCCGT

F L Q I L E K T P N R L K R I W N W R A -

TGCGAGGCTGCCAAGAAAACAAAAGCAGATGACCGA
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 816
ACGCTCCGACGGTCTTTTGTTCGTTCTACTGGCT

C E A A K K T K A D D R

```

Abbildung 11-2: Die Sequenz von CyclinT272Δ

11.3 Sequenzen der pAK-*tat*-random Ausgangsbibliotheken

Tabelle 11-1a: Darstellung der Sequenzen der pAK-*tat*-Ausgangsbibliotheken. Gezeigt ist die gesamte basische Sequenzdomäne von HIV-Tat, die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben.

pAK- <i>tat</i> -RRRR-wt-random-Bibliothek	pAK- <i>tat</i> -RRRR-C31S-random-Bibliothek
RKKRIQTVS	RKKRIQCFT
RKKRLQPGG	RKKRVQPRF
RKKRAQRLQ	RKKRVQYRR
RKKRTQSIL	RKKRRQSIR
RKKRPQQLL	RKKRRQRVS
RKKRSQQSL	RKKRFQADV
RKKRQQQPP	RKKRHQLGN
RKKRLQHPQ	RKKRKQVGQ
RKKREQRSS	RKKRVQLGY
RKKRKQEHA	RKKRVQLAD
RKKRAQWDD	RKKRFQLAG
RKKRAQGQG	RKKRPQVSG
RKKRSQQGR	RKKRNQMCN
RKKRSQLGV	RKKRGQWSH
RKKRGQIFG	RKKRGQAGS
RKKRGQMRL	RKKRAQGCR
RKKRGQNMP	RKKRAQARG
RKKRAQDSR	RKKRAQLRA
RKKRGQGAG	RKKRAQLWG
RKKRGQGRG	
RKKRYQGRS	

Tabelle 11-2a: Darstellung der Sequenzen der pAK-*tat*-Ausgangsbibliotheken. Gezeigt ist die gesamte basische Sequenzdomäne von HIV-Tat, die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben.

pAK- <i>tat</i> -RKKR-random-Bibliothek	
GVFFTRQRRR	GVFFTRQRRR
GIFIIRQRRR	GLYFRRQRRR
GLIVCRQRRR	GWSCFRQRRR
GCFFRRQRRR	GGCGFRQRRR
GFLFRRQRRR	GIYGFRQRRR
GCFGCRQRRR	GLCVFRQRRR
GHCLCRQRRR	GVFVYRQRRR
GRQWLRQRRR	GSCRVRQRRR
GPPPPRQRRR	GQVRCRQRRR
GPPPPRQRRR	GRSMQRQRRR
GRFPFRQRRR	GVNWIRQRRR
GDGLYRQRRR	GIVMCRQRRR
GFNSPRQRRR	GSFCGRQRRR
GGNCIRQRRR	GVRSWRQRRR
GVRHSRQRRR	GGVFIRQRRR
GDYLCRQRRR	GYFDFRQRRR
GEWCDRQRRR	GLLLCRQRRR
GLARVRQRRR	GVFFTRQRRR
GIGLVRQRRR	GFVVDRQRRR
GWCFVRQRRR	GIFWARQRRR

11.4 Ergebnis der Selektionen einer Ph.D.12 Peptidbibliothek

Tabelle 11-3: Sequenzen aus den verschiedenen Selektionen einer Ph.D.12 Peptidbibliothek gegen HIV-TAR-RNA. Dargestellt sind die erhaltenen 12er Peptide, die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben.

Selektion A

IRTPRRKIIRSR	NRTKHPRRP III	LIPLRTQSHHIS
KTSSRINNRRLLI	HPNIMPRTRLIH	LYHHHPKILSNT
LIHIKTLPIITNT	LLIIQPPNQ RMS	MSTITSIMRIPS
FFINSLTMTRKT	LIQIIPTRNRSR	IMTHTMRIMRRS
TRRQIRSNS SMP	IQHMPPIP NR TT	LLMIPKIIKRMM
LMTKRQIMQITT	MIRLTRRHRHR	TLIMTLRMTRKT
IPPIRR SQNISR	LNPTKPITRRHL	IIHLKNQSKRKI
LRMLTHHLHSMI	INLLQTTIRIIL	LLIKTRKTM PRR
LRMPLIHRPRI	PRTTMRRRP RRL	RQRIKLRPHNQI
LLSLILLRMRPP	LMI I IHILKTHL	

Selektion B

LDQHSYHSPFTL	VNLPMNTLWGSG	EIARHAMFPALG
NSVAHPVRHQVP	MPAPSRAMLITQ	YPSSHQTAFRPT
LLADTTTHRPWT	SVSVGMPKSPRP	AXQIKTLQDYKP
SSDKFMTVHLHA	SLNHMRLSNTAP	SMDASWPSSFNA
QYHQSTTYPLGR	LTNNSHTIGRAP	NPSLPSIMNELS
LYAHNMVMFAP	VNLPMNTLWGSG	TSGLPAVNGSAD
DYGT LAPPTPPV	NSLKYQLAQMPL	SGTGPMAFSWSS
EGFWD SLQVQSS	DPGMVSTRPWLW	QTPLQTM YHAIP
LPINKQHV AHRP	LTLDNSMLPRL	QITHVYNAEHTL
SPTLTSHQQ LHS	QSFASLTNPRVL	HVKHLEPYWSTG
TSPQLETVRSY W	SGHQ LLLNKMPN	ATPQGPTFNQFP
FPQTDNLAVPLW	HQTHITMPIPYK	QFNGLFLEPWD
HTQVTTQYVHPK	QLPSPAMERPHL	SVPVGMKSPRP

Selektion C

DSSAVSLMPKRP	IPVYANNPFRPP	AQFQTILPPTPA
LYAMTLHGPLPI	LPAWVKPPAQEA	NIVESKTPQSRR
HSVELDIGQRRM	HSARTTMQSWSG	HVVSSXSARSVH
LMSAQPQTHSTW	AIDMFPHTSMGQ	KRNIMINRPTLQ
RLRTQSPRQKRI	PKRSLSIKRSHL	NRSMRRIMRRRT
RRLPNIRLRRRI	HLIQSIMLTMLT	RTNTIRIPINLI
HPKRKRILPNTR	SRQRIRPRRNQ	TQLLLSRRSTQI
YLIHHTPSLLS		

Selektion D

STPHTHLIRH	KPVHYPPSMTFR	WTSQLRYTEQEL
FPADNGMPVLIP	QHAQLNSTSPPI	GPSTLLDTPPAE
YPPFTVHQANHS	DTNELNSSPSAL	GGWHTSFHAHGP
TPLHDLRSRPAG	NHHLTQSMGKNK	TTYKHEYFPVPR
MDPLVRSLSMVR	KTSPSLSTHTLH	DPSKPSHVHTVW
YTQHLSEFLPT	MQDPVYVLGQAY	HPGFENPLMLPY
WSKGSFPPMSSS	QLSKDLERSPTM	TEPLWGTPTNA
DKWTTKTIATTT	NTPGLPPNHLTP	DSYVHNPPPPYP
SPGNFNSKIFAS	SHTQISSAVNSP	VPQTQMSSQYYS
LPYTQYSNPHGV	NLILPGDVRHPI	GPGQTYPAGSAA
GCTFCSLPAATG	ATKQSQIDPSWP	FNNVSPPPSDSP
DAISHTWSLYTG	TPMLYHTTPQLL	VSSHVVHTPFVP
DNNDNRKLLERS	SAYVQQLPTYRG	LLPLSPGSPVST
THHVHIANHLLY	VLTHTSTGYAPS	

Selektion E

THNPDASTDPHR	HPHQSSSGLPIV	TNATPAILSPVA
KTQANFSDITLI	AKTHSPPHQLSR	LAPQSSFRDGRA
ANATDPLQETKP	HSGMHMKARQWH	DEHQEDPWAPVC
THLSTKPPSGGF	YTNNIRLPPTGE	AHQHPLPAPTRV
GLNAGAAQRFAA	DATDPMAYSL LH	TQTPGKSPVMP
HHSPWLSVQPPP	DLASSYKPHREP	HEPTGDWSYKYN
HGTTGYSYTPAT	YDASPLGHRLMI	SPHTQLELLTSK
LEGSFHQTFWSP	HPD TDYTRILRK	TLTTASMRSHFV
VLQSQDQQPTQH	VQNSHVHNTAKL	QHYTEKPTSLLSP
ESPNLHHLTRSW	SVSVGMKPSRP	TSTPHVGAASST
SWSHQSNALPP	AETVESCLAKSH	

Selektion K

HWAPSMYDYVSW	HMSIRLPASASL	NILTFHQAHGHT
GNSVNKTWTHDY	QLPMDDKKQERV	TLWTTHPMFPEQ
NKNSFDAWLQSF	NKNSFDAWLQSF	NKNSFDAWLQSF
GKHPLPNFSLSE	NKNSFDAWLQSF	SLSVSPSYSHSA
FGLTHPQFPHPM	SWWDPHFYEHPQ	

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1999 bis Februar 2002 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Willbold am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena angefertigt. Ihm danke ich an erster Stelle für die Überlassung des vielseitigen Themas, sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für so manche hilfreiche Diskussion.

Bei PD Dr. Heinrich Sticht (Universität Bayreuth) bedanke ich mich ganz herzlich für die Berechnung der Modelle der Tat-Sequenzen. Ohne ihn wäre dieser Aspekt der Arbeit nicht bearbeitet worden. Prof. Dr. Christian Lehner (Universität Bayreuth) danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe das Konfokalmikroskop zu nutzen.

Ein großer Dank geht an Thomas Stangler für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Ein weiterer ganz großer Dank geht an Lars Briese für die sofortige Lösung sämtlicher kleiner und großer Computerprobleme.

Bei Dr. Matthias Görlach (IMB Jena) bedanke ich mich ganz herzlich für die Einführung in die Welt der RNA-Gelshifts.

Für ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft möchte ich mich außerdem ganz herzlich bei Dr. Silke Hoffmann (Universität Bayreuth) bedanken. Des weiteren danke ich Cornelia Luge für das Auftragen von so manchem Sequenziergel. Bei Dr. Ute Stündl, Dr. Andrea Preusser und Katja Wiesehan bedanke ich mich für die vielen kleinen entspannenden Teepausen. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die schöne Arbeitsatmosphäre ohne die die Arbeit nur halb soviel Spaß gemacht hätte.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die mich während meiner Studien- und Promotionszeit immer „seelisch und moralisch“ unterstützt haben und so geholfen haben, Krisenzeiten zu überbrücken.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht andersweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, 19.2.2002