

Strukturelle Untersuchung des Antiterminationskomplexes von EIAV

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Marc Ehnert

aus Koblenz

Bayreuth 2002

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

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2000 bis Oktober 2002 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere unter der Leitung von Prof. Dr. Paul Rösch angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.10.02

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 29.01.04

Erster Gutachter: Prof. Dr. Paul Rösch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Franz X. Schmid

Für Ina

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Prinzipien der Antitermination	1
1.2	Die Lentiviren.....	3
1.3	Die Antiterminationskomplexe von HIV-1 und EIAV.....	6
1.3.1	Die viralen Faktoren Tat und TAR.....	9
1.3.1.1	Vergleich von HIV-1- und EIAV-Tat.....	10
1.3.1.2	Die TAR-RNA.....	13
1.3.2	Der Wirtsfaktor Cyclin T1.....	14
1.4	Strategien zur Bekämpfung von HIV und anderen Lentiviren.....	18
1.5	Ziele dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Bakterienstämme.....	21
2.1.1	<i>E. coli</i> DH5 α und <i>E. coli</i> Top10.....	21
2.1.2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) und <i>E. coli</i> TUNER.....	22
2.2	Plasmide.....	22
2.3	Oligonukleotide.....	24
2.4	Nährmedien.....	24
2.4.1	LB-Medium (Luria Bertani).....	25
2.4.2	TB-Medium.....	25
2.4.3	Minimalmedium M9.....	25
2.5	Enzyme, Standards und Chemikalien.....	26
2.6	Sonstige Materialien.....	26
2.7	Absorptionsmessung.....	27
2.7.1	Bestimmung des Bakterientiter.....	27
2.7.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	27
2.7.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	28
2.7.4	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	28
2.8	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.8.1	SDS-Gele nach Laemmli.....	29
2.8.2	Probenvorbereitung.....	29
2.8.3	Proteinstandards.....	29
2.8.4	Coomassie-Färbung.....	30

2.9	Agarosegelelektrophorese.....	30
2.10	Zentrifugationen.....	31
2.11	Isolierung von Plasmid-DNA.....	31
2.11.1	Präparation über alkalische Lyse.....	31
2.11.2	Präparation mittels Anionenaustauscherchromatographie.....	32
2.12	Fällung und Reinigung von DNA.....	32
2.12.1	Butanolpräzipitation.....	32
2.12.2	Reinigung über Silikagelmembranen.....	32
2.12.3	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	33
2.13	Enzymatische Behandlung von DNA.....	33
2.13.1	Restriktion.....	33
2.13.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden.....	33
2.13.3	Ligation.....	34
2.13.4	Sequenzierung.....	34
2.14	Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion.....	34
2.14.1	Kolonie-PCR.....	34
2.14.2	Direkte PCR-Mutagenese.....	35
2.14.3	Zwei-Schritt-PCR-Mutagenese.....	35
2.15	Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen.....	36
2.15.1	Transformation von Bakterien mit der CaCl ₂ -Methode.....	36
2.15.1.1	Herstellung normal kompetenter Zellen für die CaCl ₂ -Methode.....	36
2.15.1.2	CaCl ₂ -Methode (modifiziert nach Hanahan, 1983).....	37
2.15.2	Elektrotransformation.....	37
2.15.2.1	Herstellung elektrokompeter Zellen.....	37
2.15.2.2	Elektroporation.....	37
2.16	Kultivierung von <i>E. coli</i>	38
2.16.1	Bakterienanzucht.....	38
2.16.2	Dauerkulturen.....	38
2.16.3	Induktionsversuche.....	38
2.16.4	Zellkultivierung.....	39
2.17	Proteinreinigung.....	39
2.17.1	Zellaufschluss.....	39
2.17.2	Metallionenaffinitätschromatographie an Chelating-Sepharose.....	40
2.17.2.1	Reinigung von EIAV-Tat.....	40

2.17.2.2	Reinigung von His-eCyc.....	41
2.17.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Butyl-Sepharose.....	41
2.17.4	Kationenaustauscherchromatographie an Heparin-Sepharose.....	42
2.17.5	Ammoniumsulfat-Fällung.....	43
2.17.6	Bromcyanspaltung.....	43
2.17.7	Lyophilisation von EIAV-Tat.....	43
2.17.8	TCA-Fällung.....	43
2.17.9	Dialyse von Proteinlösungen.....	44
2.17.10	Konzentration von Proteinlösungen.....	44
2.18	CD-Spektroskopie.....	44
2.19	NMR-Spektroskopie.....	45
2.19.1	Probenvorbereitung.....	45
2.19.2	Allgemeine Messbedingungen.....	45
2.19.3	Prozessierung und Auswertung der Spektren.....	47
3	Experimente und Ergebnisse.....	48
3.1	Klonierung, Expression und Reinigung von rekombinantem Cyclin T1.....	48
3.1.1	Klonierung, Expression und Reinigung von hCycT1_V29L.....	48
3.1.1.1	Klonierung von pET11a-hCycT1_V29L.....	48
3.1.1.2	Expression von hCycT1_V29L.....	49
3.1.1.3	Reinigung von hCycT1_V29L mittels HIC.....	50
3.1.2	Klonierung, Expression und Reinigung von eCycT1 und His-eCycT1.....	52
3.1.3	Erste strukturelle Charakterisierung von Cyclin T1.....	55
3.1.3.1	CD-spektroskopische Untersuchungen.....	55
3.1.3.2	1D- ¹ H-NMR-Spektren.....	56
3.2	Untersuchungen an verkürzten Cyclin T1-Varianten.....	57
3.2.1	Strukturelle Charakterisierung von Mini_eCyc_45.....	57
3.2.2	Expression, Reinigung und Charakterisierung von Mini_eCyc_75.....	60
3.2.2.1	Klonierung von pET11a/Mini_eCyc_75.....	61
3.2.2.2	Expression von Mini_eCyc_75.....	63
3.2.2.3	Reinigung von Mini_eCyc_75 über Heparin-Sepharose.....	64
3.2.2.4	Strukturelle Charakterisierung von Mini_eCyc_75.....	66
3.3	Reinigung von isotopenmarkiertem EIAV-Tat.....	68
3.4	Rückgrat-Zuordnung von ¹³ C- ¹⁵ N-EIAV-Tat im ¹⁵ N-HSQC.....	69
3.5	Wechselwirkungen von EIAV-Tat mit TAR, Cyclin und TF53.....	75

3.5.1	Binäre Interaktionen.....	75
3.5.1.1	Wechselwirkungen zwischen EIAV-Tat und TAR-RNA.....	75
3.5.1.2	Wechselwirkungen zwischen EIAV-Tat und hCycT1_V29L.....	81
3.5.1.3	Wechselwirkungen zwischen EIAV-Tat und Mini_eCyc_45.....	83
3.5.1.4	Wechselwirkungen zwischen EIAV-Tat und Mini_eCyc_75.....	84
3.5.1.5	Interaktionen von EIAV-Tat und dem HIV-Tat/TAR-Inhibitor TF53	86
3.5.2	Wechselwirkungen von EIAV-Tat, EIAV-TAR und Mini_eCyc_45.....	89
4	Diskussion.....	93
4.1	Unterschiedliche Ansätze zur Reinigung von Cyclin T1	94
4.1.1	Reinigung verschiedener Cyclin T1 (272Δ)-Proteine.....	94
4.1.2	Verkürzte Cyclin T1-Varianten als Ersatz für Cyclin T1 (272Δ).....	98
4.2	Herstellung der beiden Komplexpartner EIAV-Tat und TAR-RNA.....	101
4.3	Strukturelle Untersuchung einzelner Bindungspartner.....	102
4.3.1	Hinweise auf α-helicale Strukturelemente bei hCycT1_V29L.....	102
4.3.2	Zuordnung von EIAV-Tat durch die Auswertung von 3D-NMR-Spektren.....	103
4.4	Wechselwirkungen von EIAV-Tat mit TAR-RNA, TF53 und Cyclin T1.....	106
4.5	Ausblick	113
5	Zusammenfassung.....	115
6	Summary.....	117
7	Abkürzungsverzeichnis.....	119
8	Literaturverzeichnis.....	122
9	Anhang.....	139
9.1	Nukleotid- und Aminosäuren-Sequenzen.....	139
9.1.1	hCycT1_V29L	139
9.1.2	eCycT1	140
9.1.3	EIAV-Tat in pETATA2E.....	141
9.2	Tabelle der zugeordneten Resonanzen von ¹³ C/ ¹⁵ N-EIAV-Tat.....	142
	Danksagung.....	151
	Erklärung.....	153

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen am Antiterminationskomplex des Lentivirus EIAV (equine infectious anemia virus) vorgestellt, die Einblicke in die strukturellen Eigenschaften der einzelnen Komplexpartner sowie ihrer Wechselwirkungen geben sollen.

Aufgrund des besonderen wissenschaftlichen Interesses an der Untersuchung von HIV (human immunodeficiency virus) als Verursacher von AIDS (acquired immune deficiency syndrome) stammen die meisten Erkenntnisse über lentivirale Antiterminationskomplexe aus dem HIV-System. Die in der folgenden Einleitung zusammengefassten Ergebnisse beziehen sich dann auf HIV, wenn für EIAV zwar keine Befunde vorliegen, die Ähnlichkeit der beiden Systeme aber vermuten lässt, dass die Mechanismen z. B. der Komplexbildung sehr ähnlich sind.

Die Antitermination wurde intensiv am Phagen λ untersucht (Greenblatt et al., 1993). Die dort gefundene Form der N-vermittelten Antitermination ähnelt sehr stark dem Mechanismus der Antitermination von HIV und anderen Lentiviren.

1.1 Prinzipien der Antitermination

Sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten steht die Genexpression unter der Kontrolle verschiedener Terminatoren, die für einen Abbruch der Transkription verantwortlich sind. Für die Antitermination, sprich für die Beeinflussung dieser Terminatoren mit der Folge einer fortgesetzten Transkription, gibt es unterschiedliche Mechanismen. Sie werden unterteilt in nicht-prozessive, wo Proteine an die mRNA binden und nahe dem Promotor gelegene intrinsische Terminatoren kontrollieren, und prozessive Mechanismen, bei denen die RNA-Polymerase II z. B. durch Hyperphosphorylierung ihrer COOH-terminalen Domäne modifiziert wird, so dass die vollständige Transkription auch über weiter entfernte Terminatoren hinweg durchlaufen werden kann.

Die beginnende Transkription bildet eine kurze mRNA, die eine Stamm-Schleifen-Struktur (Stem-Loop) ausbildet. Durch verschiedene Protein-RNA- und Protein-Protein-Wechselwirkungen kommt es entweder zu einer nicht-prozessiven Antitermination oder – bei Bindung weiterer Zellfaktoren – zu einer prozessiven Elongation der mRNA (vgl. Abb. 1.1). Dabei sind sowohl virale Faktoren (z. B. nut-RNA und N-Protein beim Phagen λ (Das, 1992), TAR-RNA und Tat-Protein bei HIV) als auch wirtseigene Faktoren (NusA, NusB, NusG und S10 bei λ ; Cyclin T1 und CDK9 bei HIV) beteiligt.

Bei den Lentiviren ist nur die Stem-Loop-Region der RNA an der Bildung des Komplexes beteiligt, während im Phagen λ auch ein 5' von diesem Bereich (*nut-boxB*) gelegener RNA-Abschnitt – genannt *nut-boxA* – beteiligt ist (vgl. Abb. 1.1). Auf den Antiterminationskomplex der Lentiviren wird in Kap. 1.3 noch näher eingegangen werden.

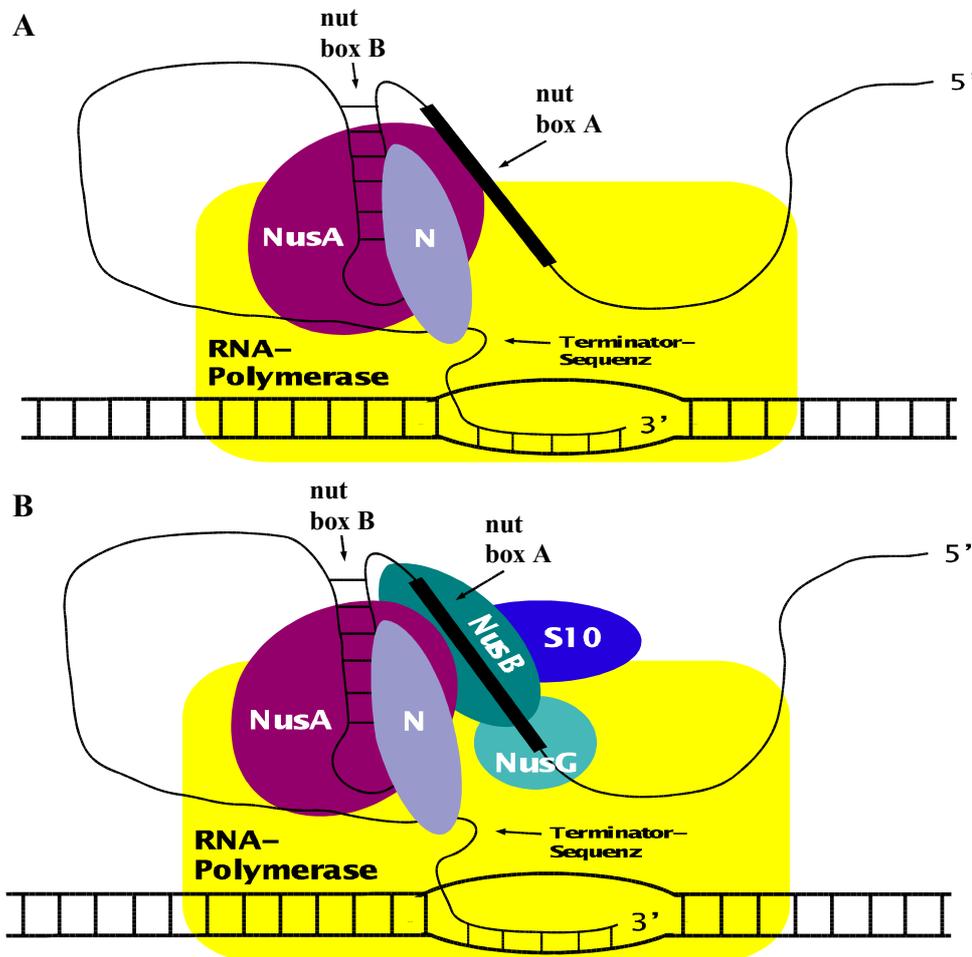


Abb. 1.1: Antitermination im Phagen λ

Nach der Initiation der Transkription dissoziiert die σ -Untereinheit von der RNA-Polymerase. Sie wird durch das NusA-Protein ersetzt, das an die elongierende RNA-Polymerase bindet. Das N-Protein bindet nach der Transkription der *nut*-Sequenz an die *nut-boxB*-Haarnadelschleife, an NusA und an die RNA-Polymerase und bildet den nicht-prozessiven Kern-Terminationskomplex (A). NusB und S10 bilden ein Heterodimer, das an die *nut-boxA*-RNA und an den Kern-Terminationskomplex bindet (B). NusG bindet schwach an die RNA-Polymerase, an NusB und an die *nut-boxA*-RNA. Während der weiteren Elongation bleiben das N-Protein, die Nus-Proteine und die *nut-boxB*-RNA mit dem Transkriptions-Elongations-Komplex assoziiert, wobei die naszierende RNA eine immer größer werdende Schleife bildet. Der so gebildete prozessive Antiterminationskomplex verhindert die Termination sowohl an intrinsischen Terminatoren, als auch an solchen, die mehrere Tausend Basenpaare hinter der *nut*-Sequenz liegen (nach Greenblatt et al., 1998).

1.2 Die Lentiviren

Die Lentiviren (Lentivirinae) sind eine Unterfamilie der Retroviren (Retroviridae), zu denen auch die Onkoviren (Onkovirinae) und Spumaviren (Spumavirinae) gehören.

Das Rous-Sarkom-Virus wurde Anfang des 20. Jahrhunderts als erstes Retrovirus beschrieben. (Rous, 1911). Im Jahr 1970 zeigten die Arbeiten von Baltimore sowie von Temin und Mizutani, dass in Retroviren der übliche genetische Informationsfluss von der DNA zur RNA umgekehrt wird. Dabei wurde das verantwortliche Enzym Reverse Transkriptase genannt (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970). In den Achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts gelang es schließlich den beiden Arbeitsgruppen um Montagnier und Gallo die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2 als Lentiviren zu identifizieren (Barré-Sinoussi et al., 1983; Popovic et al., 1984; Gallo et al., 1984).

Neben HIV und EIAV sind weitere Lentiviren bekannt, die in ihren Wirten z. B. Immunschwäche oder auch Arthritis verursachen: SIV (**s**imian **i**mmunodeficiency **v**irus) bei Affen, FIV (**f**eline **i**mmunodeficiency **v**irus) bei Katzen, BIV (**b**ovine **i**mmunodeficiency **v**irus) bei Rindern, MVV (**M**aedi-**V**isna-**V**irus) bei Schafen und CAEV (**c**aprine **a**rthritis-**e**ncephalitis **v**irus) bei Ziegen.

Das Genom der Retroviren besteht aus einzelsträngiger RNA (vgl. Abb. 1.2 A), die für die Produkte Gag, Pol und Env kodiert, die als Vorläuferproteine gebildet und später gespalten werden. Aus Gag entstehen die Strukturproteine Matrix (Ma), Capsid (Ca), Nucleocapsid (Nc) und p6. Aus Pol werden die Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) gebildet. Die Env-Proteine gp120 (**s**urface, SU) und gp41 (**t**ransmembrane, TM) bilden die äußere Virushülle. Außerdem beinhaltet das Genom von EIAV und HIV Gene, die für regulatorische Proteine (Tat und Rev) und im Falle von HIV-1 zusätzlich akzessorische Proteine (Vif, Vpr, Vpu, Nef) kodieren.

Nach der reversen Transkription der viralen RNA (Harrich & Hooker, 2002) wird die DNA in das Wirtsgenom integriert und an beiden Enden der für Proteine kodierenden Region von den LTR (**l**ong **t**erminal **r**epeats) flankiert. Dabei handelt es sich um regulatorisch wichtige Kontrollsequenzen, welche die für die virale Genexpression nötigen *cis*-aktiven, regulatorischen Promotor- und Enhancer-Elemente zur Verfügung stellen und an die zelluläre Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NfκB oder SP-1 (Haseltine, 1991) aber auch Tat-Proteine (Carruth et al., 1996; Morse et al., 1999) binden .

Die Lentiviren (langsame Viren, lat. *lentus*) entfalten ihre pathogene Wirkung häufig erst nach einer bis zu mehrere Jahre langen Latenzzeit. Die Regulation der Transkription viraler Gene findet durch an die LTR bindende Wirtszellfaktoren statt (Nabel & Baltimore, 1987; Garcia et al., 1989). Aufgrund dieser eher schwachen Transkriptionssignale liegen in der Zelle nicht genügend Primärtranskripte vor, um eine Virusvermehrung zu ermöglichen. Erst nach dem Überschreiten eines bisher nicht bekannten Schwellenwertes der Transkriptionsrate werden vermehrt virale Primärtranskripte gebildet, aus denen schließlich in anschließenden Prozessierungsschritten mRNA für Tat (transactivator of transcription) und Rev (regulator of virion expression) gebildet wird (Kim et al., 1989). Während das Tat-Protein für eine Steigerung der Transkriptionsrate sorgt (Sodroski, 1985; Emerman et al., 1987; Emerman & Malim, 1998) und auch Einfluss auf die reverse Transkription hat (Harrich et al., 1997; Harrich & Hooker, 2002), ist Rev z. B. verantwortlich für den Export ungespleißter RNA ins Cytoplasma und für das posttranskriptionale alternative Spleißen der *tat/rev*-RNA (Cullen & Malim, 1991; Emerman & Malim, 1998; Belshan et al., 2000) (vgl. Abb. 1.2 B). Erst in diesem Stadium der Infektion werden die viralen Hüll- und Membranproteine gebildet, womit neue Virionen entstehen.

HIV-1 ist als Verursacher der erworbenen Immunschwäche AIDS das wohl am besten untersuchte Lentivirus (einen Überblick geben Turner & Summers, 1999). Das ihm sehr ähnliche EIAV bewirkt bei Pferden dagegen keine dauerhafte Schwächung des Immunsystems, da es keine Lymphozyten, sondern nur Monocyten und Makrophagen befällt (McGuire et al., 1989). Die Folgen sind i. d. R. Fieber und Anämie (Cheevers & Mc Guire, 1985, 1988), die in den ersten Monaten nach der Infektion auftreten, bis die Tiere schließlich zu stillen EIAV-Trägern werden.

Die Ähnlichkeiten der Viren in Bezug auf die Regulation der Transkription machten BIV und EIAV zu bevorzugten Modellsystemen von HIV. Dabei wurden in den letzten Jahren viele Untersuchungen an den verschiedenen Antiterminationskomplexen dieser drei Viren durchgeführt (z. B. Delling et al., 1991; Puglisi et al., 1995; Ye et al., 1995; Metzger et al., 1996; Keen et al., 1996, 1997; Bieniasz et al., 1998, 1999b; Seewald et al., 1998; Chen et al., 1999; Tok et al., 2001; Richter et al., 2002a; Zhou & Rana, 2002), nicht zuletzt weil sich hier neue Ansatzpunkte für die Therapie oder gar eine Impfung vor allem gegen HIV bieten könnten (Mancebo et al., 1997), die auch nach fast zwanzig Jahren Forschung noch nicht wirksam genug sind (Veljkovic, 2001).

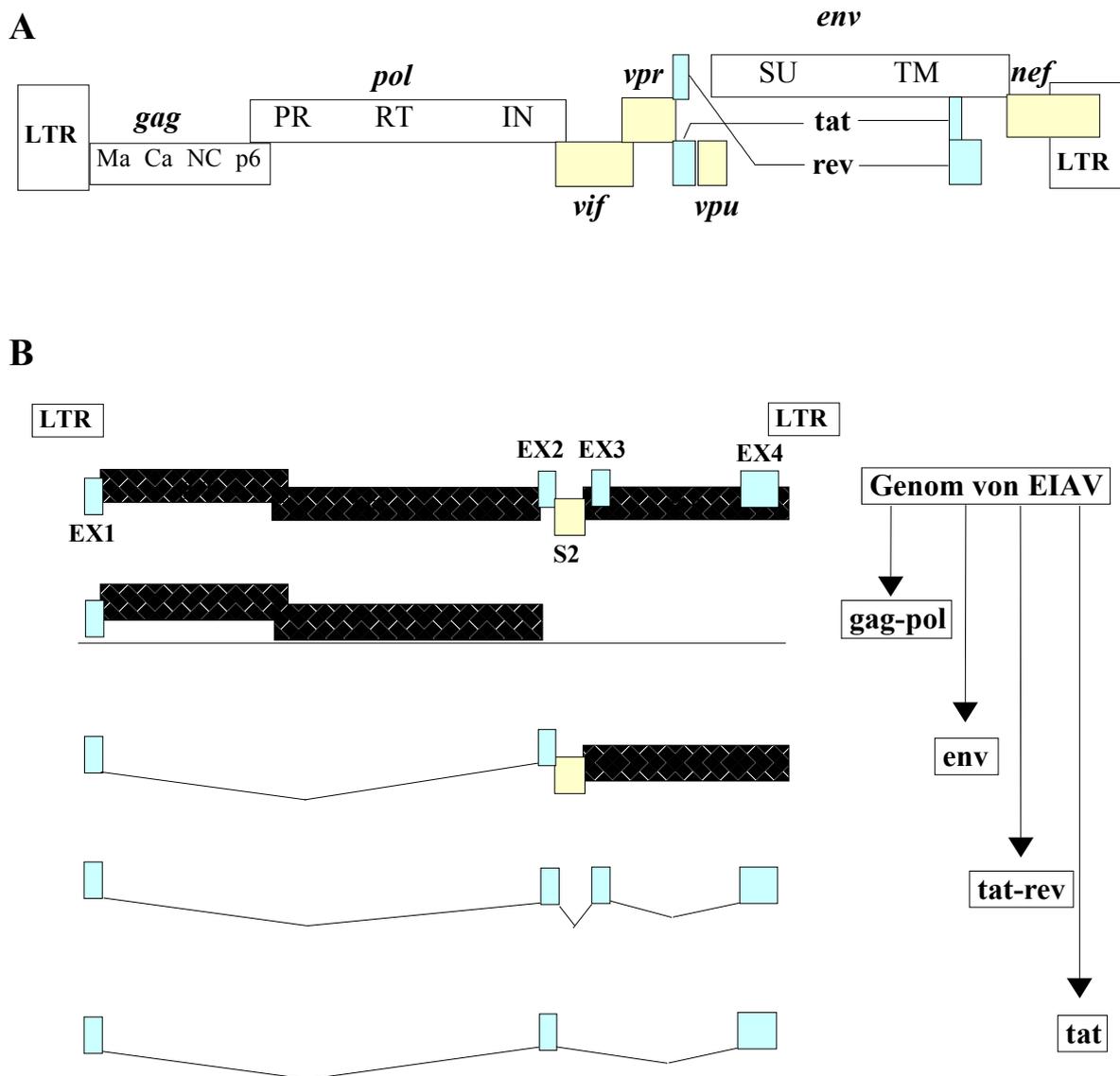


Abb. 1.2: Genom von HIV-1 und posttranskriptionale Kontrolle der Genexpression von EIAV

A: Genom von HIV-1 (verändert nach Frankel & Young, 1998). **B:** Posttranskriptionale Kontrolle der Genexpression von EIAV (verändert nach Chung & Derse, 2001). Rev reguliert den Export von *gag-pol*- und *env*-mRNA. Alternatives Spleißen führt – kontrolliert durch Rev – zur Bildung von *tat-rev* und *tat*-mRNA. Dem offenen Leserahmen S2 konnte bisher keine Bedeutung bei der Virusreplikation zugeordnet werden (Li et al., 1998); Ex: Exon.

1.3 Die Antiterminationskomplexe von HIV-1 und EIAV

Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, werden Antiterminationskomplexe sowohl aus viralen als auch aus wirtseigenen Faktoren gebildet. Dabei bindet das virale Transaktivator-Protein Tat zusammen mit P-TEFb (**p**ositive **t**ranscription **e**longation **f**actor **b**) (Price, 2000), der aus den Wirtsfaktoren Cyclin T1 und CDK9 (**c**yclin **d**ependent **k**inase) besteht, an die Stem-Loop-RNA TAR (**t**rans-**a**ctivation **r**esponse **e**lement) (Herrmann & Rice, 1995). Die durch CDK9 vermittelte Hyperphosphorylierung der carboxyterminalen Domäne der RNA-Polymerase II (RNAPII) (Fujinaga et al., 1998) bedingt die Dissoziation von den die Transkription hemmenden Faktoren DSIF und NELF (Yamaguchi et al., 1999, 2001, Ping & Rana, 2001), so dass die Verlängerung der mRNA fortschreiten kann. Tat wird durch p300 am Lysin-50 acetyliert (Kiernan et al., 1999) und kann so den Co-Aktivator PCAF binden (Mujtaba et al., 2002), der wiederum für die Dissoziation des gesamten Komplexes von der TAR-RNA und der RNAPII sorgt (vgl. Abb. 1.3). Für die Bindung von HIV-Tat an PCAF scheinen neben einem acetylierten Lysin-50 vor allem Tyrosin-47 und Arginin-53 von Tat verantwortlich zu sein (Dorr et al., 2002).

Neue Erkenntnisse zeigen, dass Lysin-50 ebenfalls an der RNA-Bindung im Loop-Bereich der TAR beteiligt ist (vgl. Abb. 1.4), während Cyclin T1 offensichtlich über den Bereich der Aminosäuren 252-260 an den Loop bindet (Richter et al., 2002b). Cyclin T1 bindet an seinem Aminoterminus (Reste 1-250) CDK9 und carboxyterminal (aa 261-270) an die Aminosäuren 1-48 von HIV-Tat, das wiederum mit den Resten 49-86 an die TAR-RNA bindet.

Das HIV-Tat-Protein bindet neuesten Erkenntnissen zufolge, nachdem ca. 15 Nukleotide synthetisiert sind, unabhängig von der RNA-Sequenz an TAR und auch an die RNA-Polymerase II. Geht diese Bindung durch die Elongation der RNA und das Mitwandern von Tat verloren, bindet scheinbar ein zweites Tat-Molekül an die RNAPII (Zhou & Rana, 2002).

D. h., Tat bindet während der Transkription sowohl an die TAR als auch an die Region der RNAPII, an der die mRNA den Komplex verlässt. Möglicherweise wird diese Bindung durch die Dissoziation von Initiatoren von oder durch eine strukturelle Veränderung der RNAPII erleichtert (Zhou & Rana, 2002).

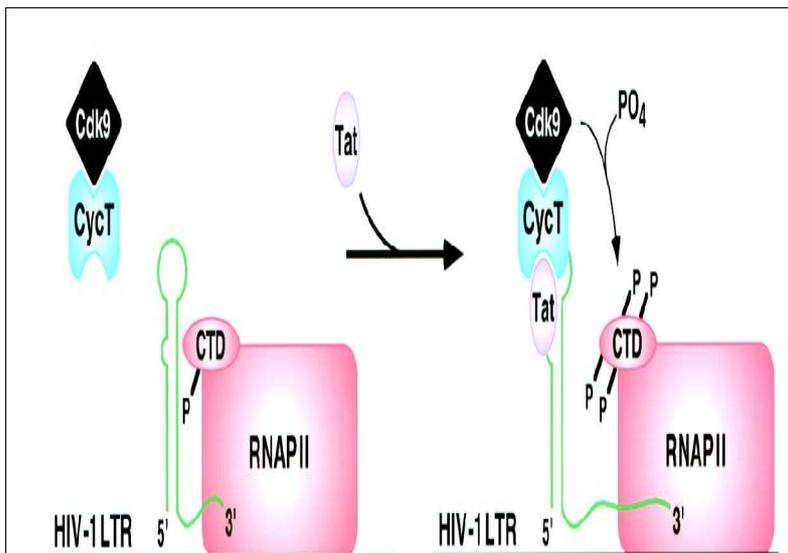


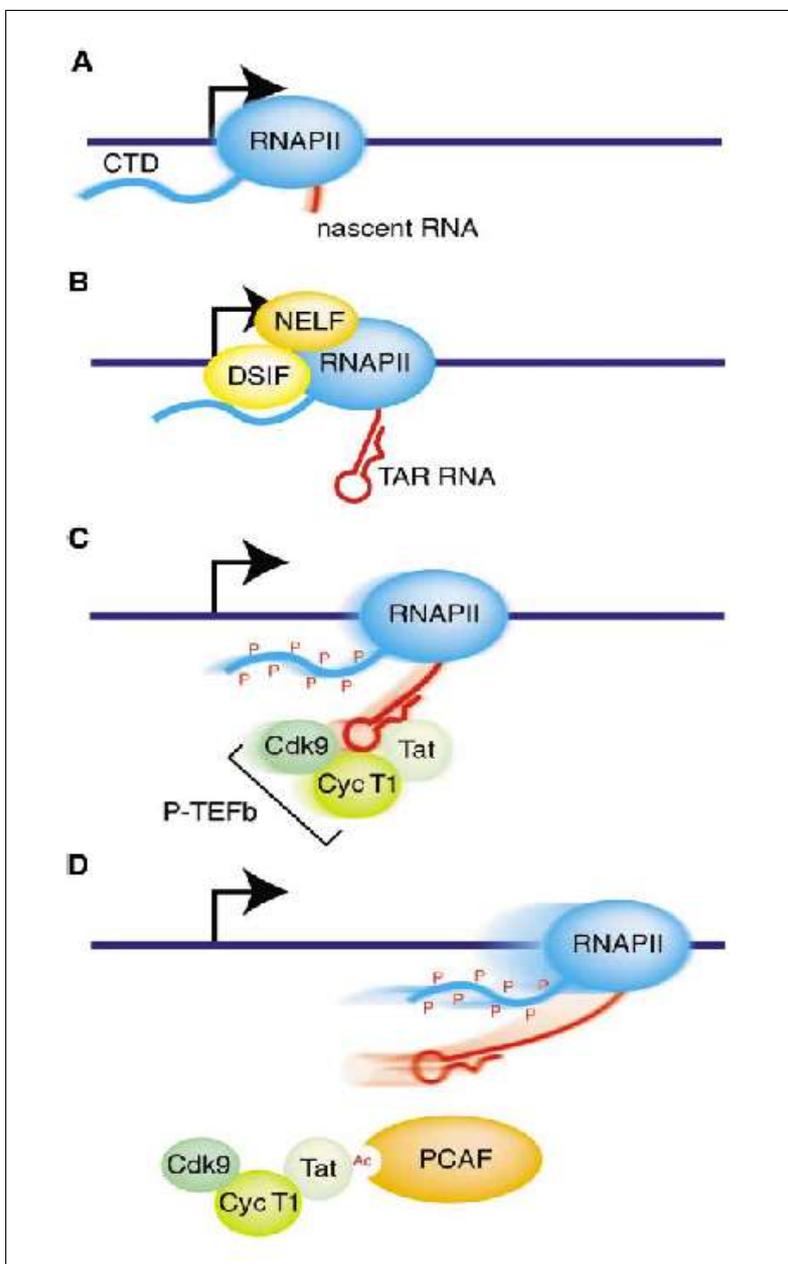
Abb. 1.3: Der Antiterminationskomplex von HIV-1

Die wichtigsten Bestandteile des Antiterminationskomplexes von HIV-1 sind TAR-RNA, Tat und der Wirtsfaktor Cyclin T1.

Oben (nach: Emerman & Malim, 1998): Cyclin T1 (CycT) bindet an Cdk9. Die carboxyterminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II (RNAPII) liegt hypophosphoryliert vor, so dass keine effiziente Elongation der mRNA

möglich ist (links). Erst durch die Bindung des viralen Proteins Tat an CycT können beide an die TAR (grün) binden und Cdk9 die CTD hyperphosphorylieren, so dass die komplette mRNA gebildet werden kann (rechts).

Unten (nach: Nakatani, 2002): Die beginnende Elongation (A) wird durch die Bindung von NELF (**n**egative **e**longation **f**actor) und DSIF (dichlor-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazol (**DRB**) sensitivity-inducing **f**actor) vorzeitig gestoppt (B). Diese beiden Faktoren dissoziieren von der RNAPII, nachdem die Bindung von P-TEFb (**p**ositive **t**ranscription **e**longation **f**actor **b**) und Tat zur Hyperphosphorylierung der CTD geführt hat (C). Der Co-Aktivator PCAF (**p**300 / **C**REB-binding protein-associated **f**actor) bindet an das zuvor von p300 acetylierte Tat und dissoziiert mit dem gesamten Komplex von der RNAPII und die Elongation wird komplettiert (D).



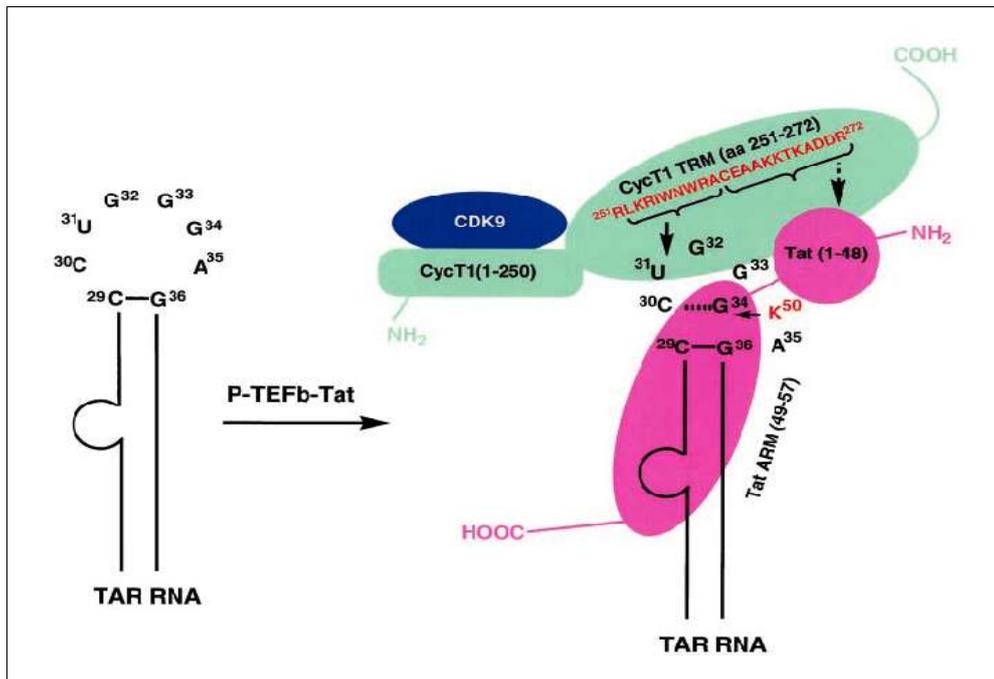


Abb. 1.4: Schema zum Komplex aus TAR-RNA und P-TEFb/Tat

Das Modell zeigt die Bindung des HIV-Tat/CyclinT1/CDK9-Komplexes an die TAR-RNA. Der aminoterminele Bereich von Cyclin T1 bindet an CDK9, während das carboxyterminale TRM (Tat/TAR recognition motif) mit der TAR-RNA und dem Tat-Protein einen ternären Komplex bildet. Tat bindet über die ersten 48 Aminosäuren an Cyclin T1; der COOH-terminale Bereich des Proteins bindet die TAR-RNA. Im Loop der RNA wird die Bindung an Cyclin über U-31 vermittelt, während Lysin-50 von HIV-Tat an G-34 bindet (nach Richter et al., 2002b).

Trotz der hohen Sequenzidentitäten der verschiedenen CyclinT1-Proteine (vgl. Abb. 1.12, Kap. 1.3.2) sowie der auftretenden Homologien bei den unterschiedlichen Tat-Varianten aus HIV, EIAV und BIV (vgl. Abb. 1.6, Kap. 1.3.1.1), werden unterschiedliche Arten der Komplexbildung diskutiert (Taube et al., 1999; vgl. Abb. 1.5). HIV-Tat und das humane Cyclin T1 (hCycT1) binden wahrscheinlich über Cysteine aneinander, die über Zinkionen komplexiert sind (Garber et al., 1998). Im Komplex involviert sind sowohl der Loop als auch der Bulge der TAR (Feng & Holland, 1988; Berkhout & Jeang, 1989, 1991; Cordingley et al., 1990; Dingwall et al., 1990; Roy et al., 1990a, 1990b). EIAV-Tat bildet dagegen möglicherweise Leucin-Brücken mit Cyclin T1 aus Pferden (eCycT1) (Taube et al., 2000). Beide binden aber wohl nur an den Loop der TAR-RNA. Im BIV-System scheint sogar nur der Bulge der BIV-TAR betroffen zu sein (Barboric et al., 2000).

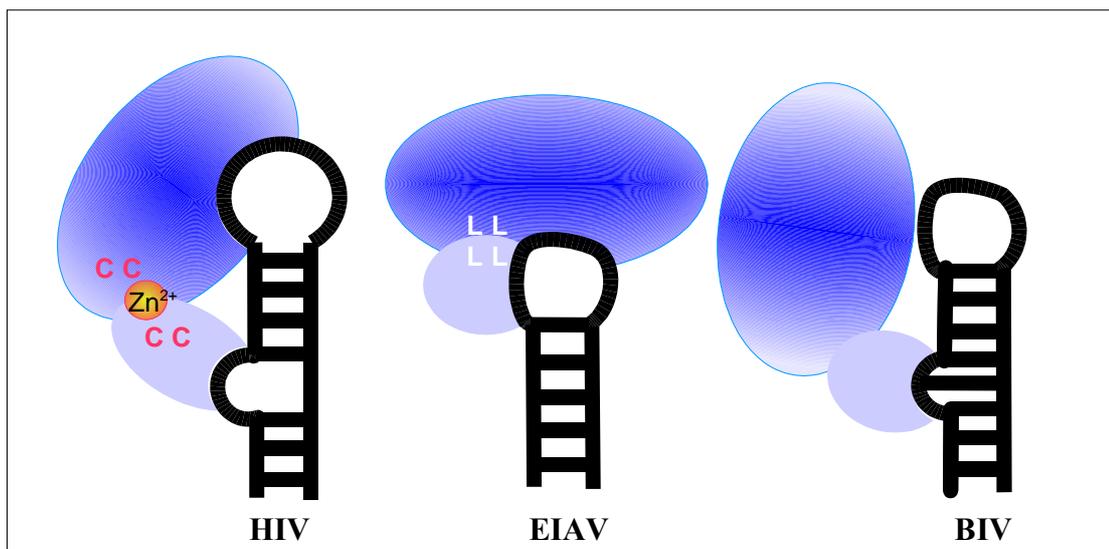


Abb. 1.5: Modelle der Antiterminationskomplexe von HIV, EIAV und BIV.

Die Interaktion von Tat (hellblau) und Cyclin T1 (blau-schattiert) erfolgt bei HIV über Cysteine und Zinkionen, während EIAV-Tat und eCycT1 Leucin-Brücken bilden. BIV-Tat bindet unabhängig von Wirtsfaktoren an die TAR-RNA (schwarz in Stem-Loop-Form) und wirkt zusammen mit verschiedenen CyclinT1-Spezies aktivierend (Barboric et al., 2000). Auch bei der TAR-Bindung gibt es Unterschiede: HIV-TAR bindet über Loop und Bulge, EIAV-Tat nur über den Loop an P-TEFb/Tat. Peptide auf BIV-Tat-Basis binden nur im Bulge-Bereich der BIV-TAR (Puglisi et al., 1995).

1.3.1 Die viralen Faktoren Tat und TAR

Die lentiviralen Tat-Proteine zeigen untereinander einige Unterschiede (vgl. Abb. 1.6), aufgrund derer sie in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Die Transaktivatoren von HIV, SIV, und BIV verfügen über eine dem Aminoterminus folgende cysteinreiche Domäne, gefolgt von einer Kernregion (Core) und einer basischen Domäne, der wiederum eine glutaminreiche Region und schließlich der Carboxyterminus folgen. Vertreter dieser Klasse binden über ein argininreiches Motiv (ARM) direkt an die TAR-RNA (Endo et al., 1989; Dingwall et al., 1989; Kamine et al., 1991; Chen & Frankel, 1994; Liu et al., 1996).

EIAV-Tat ist sehr ähnlich aufgebaut, besitzt aber keine cysteinreiche Domäne. Es bindet an DNA und auch an TAR-RNA (Willbold et al., 1998, Taube et al., 2000), wofür es allerdings der Unterstützung weiterer Faktoren bedarf (Suñé et al., 2000).

Die Vertreter der dritten Klasse MVV- und CAEV-Tat interagieren über den Transkriptionsfaktor AP-1 mit DNA und binden nicht direkt an Nukleinsäuren. In diesen Antiterminationssystemen konnten weder TAR-RNA noch Cyclin nachgewiesen werden.

HIV-1	CTN-CYCKKCC	FHCQVCFITKALGISYG-----	RKKRRQRRR---
HIV-2	CTNKCYCKRCS	FHCQLCFSKKGLGISYE-----	RKGRRRRTPRK-
SIV	CTNKCFCCKCC	YHCQFCFLRKGLGITYH-AF--	RTRRKK-----
BIV	CPH-CCCPICS	WHCQLCFLQKNLGVNYGSGPRP	RGTRGKGRRIRR
EIAV	-----	YHCQLCFLR-SLGIDYLDASL-	RKKNKQRLK---
Konsens	-----	-HCQ-CF----LG--Y-----	R-----
	Cysteinreich	Core-Domäne	basische Domäne

Abb. 1.6: Sequenzvergleich verschiedener Tat-Proteine

Die meisten Übereinstimmungen finden sich in der Core-Domäne. Die cysteinreiche Domäne mit hoch konservierten Cysteinen bei HIV, SIV und BIV existiert bei EIAV gar nicht. Deshalb wird eine unterschiedliche TAR-Bindung von HIV- und EIAV-Tat diskutiert. Der ARM (**arginine rich motif**) stellt zwar die RNA-Binderegion dar, unterliegt aber relativ vielen Veränderungen; wichtig ist hier vor allem das Vorhandensein basischer Aminosäuren. Deren Position ist aber weniger konserviert.

Die weitaus meisten Ergebnisse liegen für HIV-1 und EIAV vor, so dass im Folgenden – auch wegen des näheren Bezuges zur gesamten Arbeit – hauptsächlich auf diese beiden Systeme eingegangen werden soll.

1.3.1.1 Vergleich von HIV-1- und EIAV-Tat

Trotz der Unterschiede gleichen sich HIV- und EIAV-Tat vor allem im Bereich des Core, wo die meisten konservierten Aminosäuren auftreten (vgl. Abb. 1.7). Diese Kernregion ist zusammen mit dem ARM verantwortlich für die TAR-Bindung. Sie trägt zur Spezifität der Tat/TAR-Bindung bei (Churcher et al., 1993), tritt aber ebenso mit dem TBP (**TATA-binding-protein**) in Verbindung (Kashanchi et al., 1994; Veschambre et al., 1995). Auch die argininreichen Motive unterscheiden sich kaum in ihrer Zusammensetzung. So stellte sich in den letzten Jahren durch zahlreiche Untersuchungen heraus, dass vor allem die Aminosäuren Arginin-52 und Lysin-50 von HIV-Tat wichtig für die Ausbildung des Antiterminationskomplexes sind (Mujtaba et al., 2002). Bei EIAV-Tat spielt neben anderen Resten das in der basischen Region enthaltene Glutamin-60 eine wichtige Rolle bei der TAR-Bindung (Derse & Newbold, 1993). Zwischen Core- und basischer Domäne befindet sich im Falle von EIAV-Tat zusätzlich eine Linkerregion (LDASL). Eine Deletion dieses Bereiches führt zum Verlust der Transaktivierungsaktivität (Derse & Newbold, 1993).

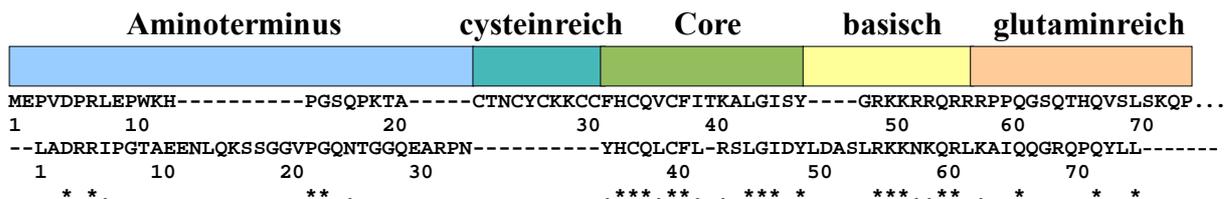


Abb. 1.7: Sequenzalignment von HIV- und EIAV-Tat

Die meisten Übereinstimmungen zwischen HIV-Tat (Isolat Zaire 2, obere Sequenz) und EIAV-Tat (untere Sequenz) finden sich im Bereich des Core und der basischen Domäne. (*): gleiche Aminosäure; (.): ähnliche Aminosäure.

An den aminoterminalen Enden finden sich nur wenige Übereinstimmungen zwischen HIV- und EIAV-Tat. Hier wird eine Interaktion mit dem Wirtsfaktor Cyclin T1 vermutet (vgl. Abb. 1.4). Deletionsmutanten von HIV-Tat, bei denen die Reste 2-6 bzw. 3-19 fehlten, waren vollständig inaktiv (Kuppuswamy et al., 1989). Mutanten der Art D5A bzw. E2A zeigten verminderte Transaktivierungsaktivität (Rice & Carlotti, 1990b).

Die nur bei HIV-Tat vorkommende cysteinreiche Domäne ist ebenfalls in die Cyclin-Bindung involviert. Mutationen in dieser Region sowie an den Cysteinen-34 und 37 der Core-Domäne führten zum Verlust von Aktivität (Garcia et al., 1988; Rice & Carlotti, 1990a). Da bei EIAV-Tat kein ähnlicher Bereich vorhanden ist, ist die geltende Meinung, dass sich beide Proteine vor allem in der Bindung zum jeweiligen Cyclin T1 unterscheiden. So sind wahrscheinlich die in der Linkerregion zwischen Core- und basischer Domäne (s. o.) angesiedelten Leucine-50 und 54 an dieser Protein/Protein-Wechselwirkung beteiligt (vgl. Abb. 1.5 und Abb. 1.8) (Taube et al., 2000).

Die glutaminreiche Domäne trägt zwar nicht wesentlich zur Bindungsaktivität bei, eine komplette Deletion bei HIV-Tat führt allerdings zu einem Verlust an Aktivität (Garcia et al., 1988). Bei EIAV-Tat spielen die die glutaminreiche Domäne abschließenden Leucine- 74 und 75 offensichtlich eine wichtige Rolle bei der *trans*-Aktivierung (Noiman et al., 1991; Carroll et al., 1991; 1992; Derse & Newbold, 1993; Taube et al., 2000).

Strukturelle Daten der beiden Tat-Proteine konnten mit Hilfe der NMR (**n**uclear **m**agnetic resonance) gewonnen werden (vgl. Abb. 1.8). Diese Untersuchungen zeigten, dass beide Proteine in wässriger Lösung kaum reguläre Sekundärstruktur besitzen (Willbold et al. 1994, 1996; Bayer et al., 1995), EIAV-Tat bei der Zugabe von Trifluorethanol (TFE) als strukturstabilisierendes Agens aber α -helikale Bereiche aufweist, die sich hauptsächlich im Core und in der basischen Domäne befinden (Sticht et al., 1994). Das daraus resultierende Helix-Loop-Helix-Turn-Helix-Motiv (HLHTH) zeigt Ähnlichkeiten zu Homeodomänen

(Rösch & Willbold, 1996). Möglicherweise werden diese Sekundärstrukturelemente nach einer Bindung an z. B. Cyclin T1 stabilisiert, so dass erst daraufhin eine bessere Bindung an TAR-RNA gewährleistet ist (Zhang et al., 2000).



Abb. 1.8: Struktur von EIAV-Tat in wässriger Lösung

Die Struktur von EIAV-Tat (PDB-Eintrag: 1TVT) nach Willbold et al. (1994) zeigt in wässriger Lösung nur wenig ausgeprägte Sekundärstrukturelemente. Die Leucine- 50, 54, 74 und 75 (dunkelgrün) bilden möglicherweise Kontakte, die eine Bindung an TAR-RNA verhindern, bis diese Kontakte durch eine Bindung an Cyclin T1 das ARM freigeben (Taube et al., 2000). Core- (hellgrün) und basische Domäne (orange) sind an der Ausbildung des Antiterminationskomplexes beteiligt.

Tat-Proteine verfügen neben ihrer Transaktivierungsaktivität über zahlreiche andere Wirkungen, die insbesondere HIV-infizierte Personen betreffen. HIV-Tat bewirkt z. B. bei verschiedenen Zelltypen Apoptose (Gavriil et al., 2000; Park et al., 2001), die sich beispielsweise auf die motorischen Fähigkeiten der Patienten auswirkt, und wird in Zusammenhang mit einer aggressiven Form des Kaposi's Sarcom gebracht, das häufig bei AIDS-Patienten auftritt (Vogel et al., 1988; Ensoli et al., 1990; Ensoli & Cafaro, 1996; Morini et al., 2000; Yen-Moore et al., 2000).

1.3.1.2 Die TAR-RNA

Die TAR-RNA von HIV und EIAV besteht aus einer Stamm-Schleifen-Struktur (Stem-Loop), die durch Basenpaare zustande kommt, deren Ausbildung wichtig für die spezifische Tat/TAR-Bindung ist (Muesing et al., 1987; Berkhout et al., 1989; Selby et al., 1989). HIV-TAR besitzt zudem am Stamm eine Ausbauchung (Bulge), die durch ungepaarte Uracile gebildet wird (vgl. Abb. 1.9) und unmittelbar an der Komplexbildung mit HIV-Tat beteiligt ist. EIAV-TAR enthält neben dem Loop nur ein ungepaartes Nukleotid, das aber offensichtlich nicht in eine Tat-Bindung involviert ist.

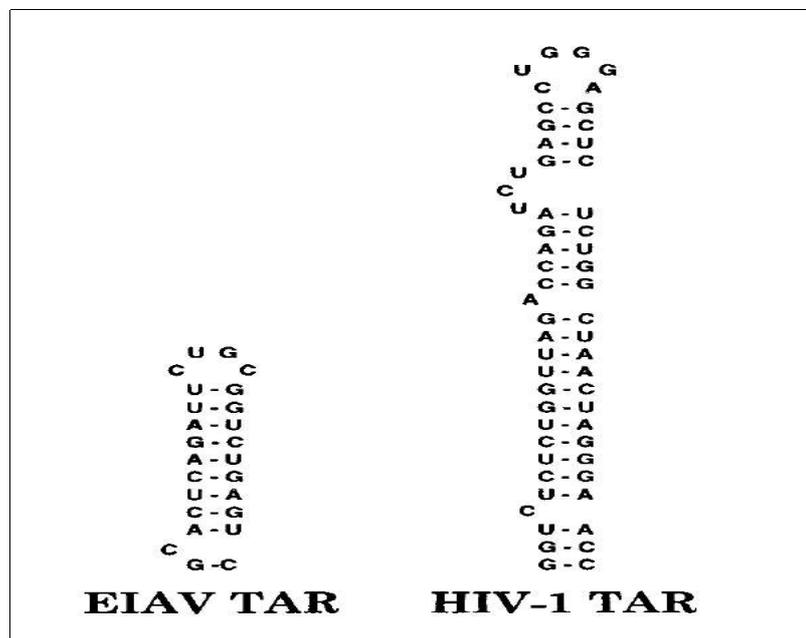


Abb. 1.9: Stem-Loop-Struktur der EIAV- und HIV-TAR

Der Loop der HIV-TAR besteht aus sechs, der von EIAV-TAR nur aus vier ungepaarten Basen. Eine Ausbauchung formt sich nur bei HIV-TAR aus den drei Basen U-C-U oder U-U-U (nach Bieniasz et al., 1999a).

Die Bindung von HIV-Tat an TAR wird über elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken in der Großen Furche (major groove) vermittelt (Weeks & Crothers, 1991; Tao & Frankel, 1993; Hamy et al., 1993). Die Bindung im Loop-Bereich der HIV-TAR erfolgt über U-31 bzw. G-34, die an die CyclinT1-Region 252-260 bzw. an das Lysin-50 des Tat-Proteins binden (vgl. Abb. 1.4; Richter et al., 2002b). Die Strukturbestimmung mittels NMR der HIV-TAR-RNA in An- und Abwesenheit von Tat(37-72) (vgl. Abb. 1.10) gelang Aboul-ela et al. (1995, 1996).

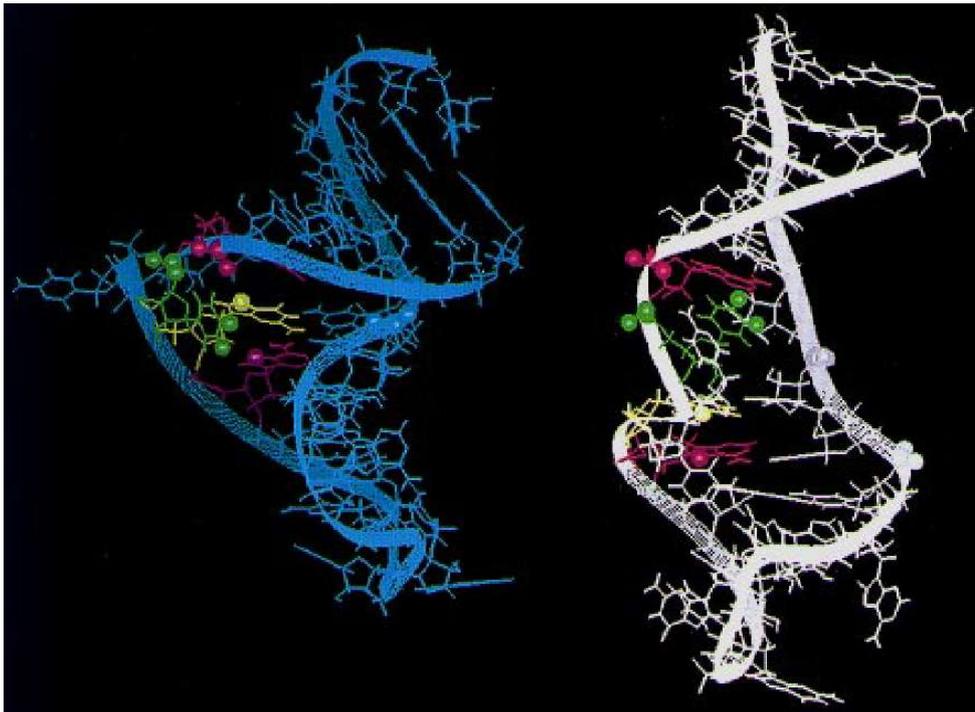


Abb. 1.10: Große Furche der HIV-TAR-RNA

Die Basen A-22 und A-27 (lila) sowie U-23 (grün) und G-26 (gelb) sind an der Tat-Bindung beteiligt. Links: ungebundene TAR, rechts: an Tat gebundene TAR-RNA (nach Aboul-ela et al., 1996).

Auch an EIAV-TAR wurden strukturelle Untersuchungen durchgeführt (Hoffman & White, 1995), die zeigten, dass der RNA-Stamm eine Helix bildet. Diese wird von zwei U-G-Paaren abgeschlossen, woran sich der Loop aus den vier Basen C-U-G-C anschließt (vgl. Abb. 1.9), der für die Bindung an EIAV-Tat verantwortlich ist.

1.3.2 Der Wirtsfaktor Cyclin T1

Schon früher wurden immer wieder mit Tat interagierende und dessen Aktivität steigernde Proteine beschrieben (z. B. Desai et al., 1991; Ohana et al., 1993, Yu et al., 1995). Später wurde bekannt, dass die Aktivität von Tat durch wirtseigene Kinasen stimuliert wird, die eine Phosphorylierung der RNA-Polymerase II bewirken (Herrman & Rice, 1995; Yang et al., 1996, Garcia-Martinez et al., 1997). Im Jahr 1998 isolierten die Mitarbeiter von D. Price die cDNA von Cyclin T aus *Drosophila* (Peng et al., 1998a) und die Mitarbeiter von K. Jones das 87 kDa große und aus 726 Aminosäuren bestehende Cyclin T (Wei et al., 1998), das gebunden an die cyclinabhängige Kinase CDK9 Teil des Antiterminationskomplexes ist (Fujinaga et al.,

1998; Zhou et al., 1998). Die Kinase CDK9 (früher: PITALRE; Gold et al., 1998) bindet nicht nur an Cyclin T1 und T2 (Peng et al., 1998b), sondern auch an andere Proteine und ist in verschiedenste zellphysiologische Prozesse involviert (einen Überblick geben De Falco & Giordano, 1998). Der aus Cyclin T1 und CDK9 bestehende Wirtsfaktor wurde zunächst mit TAK (**Tat-associated kinase**) bezeichnet und stellte sich als eine Form des aus *Drosophila* bekannten P-TEFb (**positive transcription elongation factor**) heraus (Mancebo et al., 1997). Eine zelluläre Kontrolle der Bindung von P-TEFb an Tat über snRNA (**s**mall **n**uclear RNA) wurde kürzlich von Yang et al. (2001) und Nguyen et al. (2001) beschrieben.

Das 726 Aminosäuren große Cyclin T1 besteht aus Regionen mit verschiedenen Eigenschaften: Die ersten 250 Reste gehören zu einer Region mit zwei Cyclin-Boxen, an die sich ein NLS (**n**uclear **l**ocalization **f**actor) anschließt; es folgt ein Bereich von ca. 150 Resten mit unbekannter Funktion, worauf sich eine Coil-Region anschließt; zwischen den Resten 506-530 befindet sich eine histidinreiche Sequenzfolge, die von weiteren Sequenzabschnitten mit nicht bekannter Funktion eingerahmt wird; abgeschlossen wird das Protein von einem PEST-Motiv (vgl. Abb. 1.11). Die ersten 272 Aminosäuren von Cyclin T1 konnten in zahlreichen Studien als wichtig für die Bindungsaktivität an HIV-Tat und TAR ermittelt werden (Garber et al., 1998; Fujinaga et al., 1999; Ivanov et al., 1999), so dass viele der späteren Untersuchungen mit verkürzten CyclinT1(272Δ)-Varianten durchgeführt wurden.

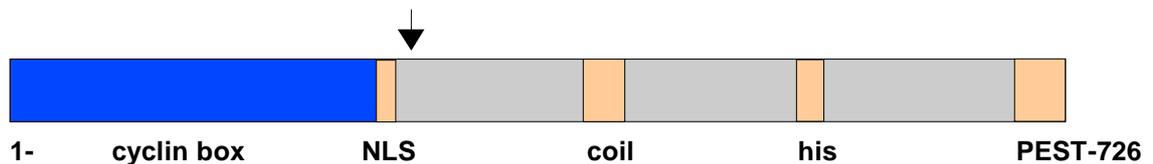


Abb. 1.11: Aufbau des humanen CyclinT1-Proteins

Die aktivierende Domäne von Cyclin T1 befindet sich innerhalb der ersten 272 Aminosäuren (Pfeil) des insgesamt 726 Reste großen Proteins.

Die CyclinT1-Proteine der verschiedenen Spezies unterscheiden sich kaum voneinander (vgl. Abb. 1.12), weshalb sehr ähnliche Wirkmechanismen postuliert werden. So sind durchaus einige der CyclinT1-Varianten untereinander austauschbar ohne einen Verlust an Aktivität (Albrecht et al., 2000). Oder der Austausch nur einer Aminosäure bewirkt schon eine Bindung an wirtsfremde Tat-Proteine (Garber et al., 1998). Eine hCycT1-Mutante, die an der Stelle 29 statt eines Valins ein Leucin trägt, kann z. B. zur Aktivität von EIAV-Tat beitragen (Taube et al., 2000). Deshalb wird vermutet, dass der Bereich um das Leucin-29 von eCycT1 bei der Bindung an EIAV-Tat eine wichtige Rolle spielt.

hCycT1	*****	*****	*****v*	p*****	*****	50
eCycT1_C	*****	*****	*****l*	p*****	*****	
eCycT1_P	*****	*****	*****l*	p*****	*****	
mCycT1	*****	*****	*****v*	s*****	*****	
cCycT1	*****	*****	*****l*	p*****	*****	
hCycT2B	-masgrgass	**f*****	*t***c*ve	a*****c**	****i*e**	
Konsens	MEGERKNNK	RWYFTREQLE	NSPSRRFG-D	-DKELSYRQQ	AANLLQDMGQ	
hCycT1	*****	*****	*****q*pg	n*v*****	****e****	100
eCycT1_C	*****	*****	*****q*hr	n*v*****	****e****	
eCycT1_P	*****	*****	*****q*hr	n*v*****	****g****	
mCycT1	*****	*****	*****hr	y*m*****	****e****	
cCycT1	*****	*****	*****r*pg	n*v*****	****g****	
hCycT2B	*****	*****	*hh***k*nk	niisst**	****e*ar*	
Konsens	RLNVSQLTIN	TAIVYMHRFY	MIQSFT-F--	-S-APAALFL	AAKVE-QPKK	
hCycT1	*****t	*****	*****	*****	*****	150
eCycT1_C	*****a	*****	*****	*****	*****	
eCycT1_P	*****a	*****	*****	*****	*****	
mCycT1	*****t	*****	*****	*****	*****	
cCycT1	*****a	*****	*****	*****	*****	
hCycT2B	*****a	***l*p*1*	*kcd*****t	*e*****m	*****i**	
Konsens	LEHVIKVAH-	CLHPQESLPD	TRSEAYLQQV	QDLVILESI	LQTLGFELTI	
HCycT1	*****	*****	*****	*****	*****	200
eCycT1_C	*****	*****	*****	*****	*****	
eCycT1_P	*****	*****	*****	*****	*****	
mCycT1	*****	*****	*****	*****	*****	
cCycT1	*****	*****	*****	*****	*****	
hCycT2B	e***d****	*****	*****	*****c**	*k*t*i****	
Konsens	DHPHTHVVKC	TQLVRASKDL	AQTSYFMATN	SLHLTTFSLQ	YTPPVVACVC	
hCycT1	*****	*****	*****	*****	f*****n	250
eCycT1_C	*****	*****	*****	*****	f*****n	
eCycT1_P	*****	*****	*****	*****	f*****n	
mCycT1	*****	*****	*****	*****	f*****s	
cCycT1	*****	*****	*****	*****	l*****n	
hCycT2B	*****	*****	*****p**	*****	f*****n	
Konsens	IHLACKWSNW	EIPVSTDGKH	WWEYVDATVT	LELLEDELTHE	-LQILEKTP-	
hCycT1	***w****	ce**k***a*	***t**k***	*****s	*****	300
eCycT1_C	***r****	cq**k***a*	***t**n***	*****s	*****	
eCycT1_P	***w****	ce**k***a*	***t**k***	*****s	*****	
mCycT1	***r****	yq**m***p*	***a**n***	*****t	*****	
cCycT1	***w****	ce**k***a*	***t**k***	*****s	*****	
hCycT2B	***k**r****	nq**r**p*v*	gqvsetpllq	sslvqnsilv	d*v*gvptnp	
Konsens	RLKRI-NWRA	--AA-KTK-D	DRG-DE-TSE	QTILNMISQ-	SSDTTIAGLM	

Abb. 1.12: Sequenzalignment von CyclinT-Proteinen

Das Sequenzalignment macht die hohe Identität der verschiedenen CyclinT-Proteine deutlich. Besonders hoch sind die Identitäten unter den CyclinT1-Varianten aus Mensch (**human**), Pferd (**equine**), Maus (**murine**) und Hund (**canine**). Das nahe verwandte hCycT2B zeigt dagegen schon mehrere Abweichungen von der Konsensus-Sequenz. eCycT1_C: Sequenz von Pferdecyclin aus der Arbeitsgruppe von Cullen (Bieniasz et al., 1999a); eCycT1_P: Sequenz von Pferdecyclin aus der Arbeitsgruppe von Peterlin (Taube et al., 2000). (*): identische Aminosäuren in allen verglichenen CyclinT-Proteinen.

Die Bestimmung einer 3D-Struktur von CyclinT1-Protein konnte bisher nicht durchgeführt werden. Dennoch existieren für die ersten 272 Aminosäuren von hCycT1 Modelle, die aufgrund der vorhandenen Cyclin-Boxen auf der Kristallstruktur von Cyclin H beruhen. Diese Modelle zeigen ein stark α -helikales Protein (vgl. Abb. 1.13). Die für die Bindung an Tat-

Proteine verantwortliche Region wird an den amino- und carboxyterminalen Helices vermutet. Dort sollen vor allem das Cystein-261 bei hCyclin T1 (Garber et al., 1998; Fujinaga et al., 1999) und das Leucin-29 bei eCyclin T1 (Taube et al., 2000) in die Bindung an das jeweilige Tat-Protein involviert sein. Vermutet wird, dass die Leucin-Brücken mit EIAV-Tat über die Leucine- 29, 35, 44 und 45 vermittelt werden. Das Modell zeigt, dass sich die beiden terminalen Helices in der dreidimensionalen Struktur nahe kommen und so möglicherweise eine Tat/TAR-Bindungsdomäne bilden, die räumlich entgegengesetzt der postulierten CDK9-Bindestelle zu liegen kommt (vgl. Abb. 1.13).

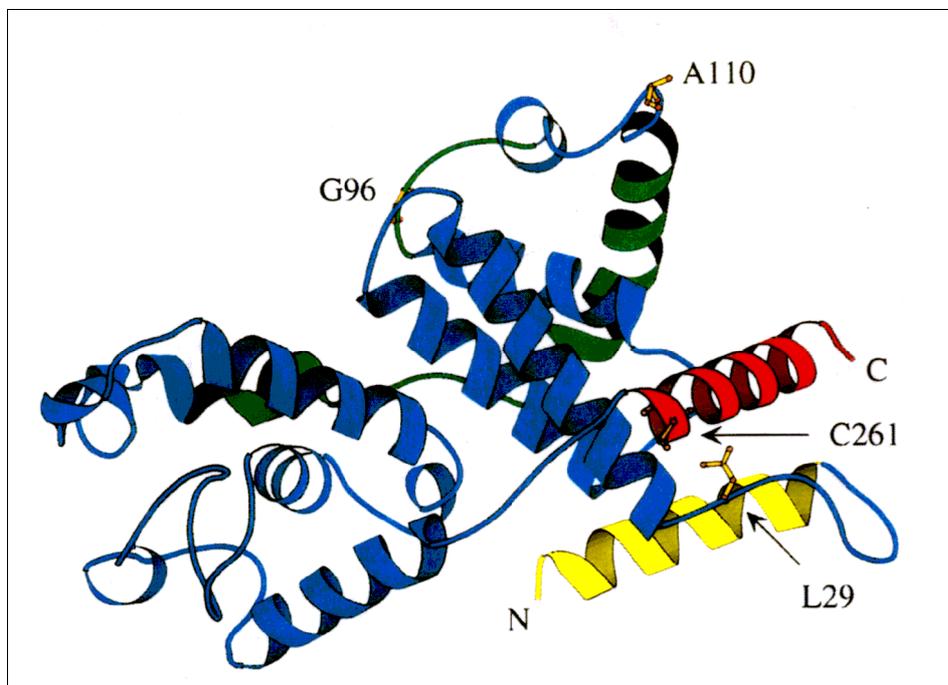


Abb. 1.13: Modell von eCyclinT1(272Δ)

Die Cyclin-Boxen (blau und grün) werden von 2 x 5 α -Helices gebildet. Die für die Spezifität der Cycline verantwortlichen amino- bzw. carboxyterminalen Helices sind gelb bzw. rot gefärbt. In Grün ist die potentielle CDK9-Bindestelle dargestellt, die auf der Kristallstruktur von CyclinA im Komplex mit CDK2 beruht. Die Aminosäuren Cystein-261 bzw. Leucin-29, die für eine Bindung an Tat-Proteine verantwortlich gemacht werden (Garber et al., 1998; Taube et al., 2000) sind als Stäbchen dargestellt. Glycin-96 und Alanin-110 sind neben Leucin-29 die einzigen zu hCycT1 unterschiedlichen Positionen, die auch in cCycT1 konserviert sind (vgl. Abb. 1.12), befinden sich aber in der CDK9-Binderegion (nach Taube et al., 2000).

1.4 Strategien zur Bekämpfung von HIV und anderen Lentiviren

Die meisten der derzeit gegen HIV angewendeten Medikamente greifen direkt die Reverse Transkriptase an oder werden ins Virusgenom integriert, so dass das Enzym die reverse Transkription abbricht. Aufgrund der zunehmenden Resistenz des Virus gegen viele Arzneimittel wird seit Jahren nach einem Impfstoff gesucht (Nabel, 2001). Mögliche Ansatzpunkte wie die Hüllproteine gp41 und gp120 konnten bisher nicht genutzt werden. Die große Variabilität des Erregers erschwert zudem den Angriff mittels Impfstoffen.

Seitdem die Bedeutung des Antiterminationskomplexes für die Virusreplikation bekannt ist und dessen Aufbau aus Tat-Protein, TAR-RNA und wirtseigenen Faktoren untersucht wurde, rückt dieser Komplex nicht zuletzt wegen seiner hoch konservierten Regionen auf RNA- und Protein-Ebene immer mehr in den Focus der Forschung nach einer Strategie zur Bekämpfung von AIDS. So wurden in den letzten Jahren zahlreiche Versuche unternommen, die Bindung von Tat an TAR-RNA zu hemmen oder gar zu unterbinden, indem die Protein-Bindestellen auf der RNA durch andere Moleküle belegt wurden (Hamy et al., 1998; Mayhood et al., 2000; Kaushik et al., 2002; Patino et al., 2002). Es konnten Substanzen gefunden werden, die spezifisch an den Bulge der HIV-TAR binden (Lind et al., 2002). Andere Untersuchungen wiesen darauf hin, dass z. B. die Bindung des Antibiotikums Neomycin B an der Kleinen Furche der TAR zu einer strukturellen Veränderung der RNA führt, durch die in der Großen Furche keine effiziente Tat-Bindung mehr stattfinden kann (Faber et al., 2000). Auch neu isolierte Antibiotika zeigen teilweise Tat-inhibitorische Wirkung (Jayasuriya et al., 2002).

Aber auch das Tat-Protein selbst ist sowohl als Angriffspunkt für die Behandlung von AIDS (Yamamoto et al., 1997, 2000) als auch als Bestandteil eines Impfstoffes (Agwale et al., 2002; Betti et al., 2001; Hel et al., 2002) in der Diskussion. Die Mitarbeiter von T. Klimkait konnten spezifische Inhibitoren der Tat/TAR-Bindung – z. B. TF53 (vgl. Abb. 1.14) – isolieren bzw. synthetisieren, die direkt an HIV-Tat binden und eine Bindung der TAR-RNA schon in geringer Dosierung hemmen (Hamy et al., 1997, 2000).

Diskutiert wird auch, ob die Beeinflussung der wirtseigenen Faktoren Cyclin T1 und CDK9 Möglichkeiten bieten könnte, die Transkription viraler DNA in mRNA zu unterbinden (De Azevedo et al., 2002; Sausville et al., 2002). Da aber die Proteine des jeweiligen Wirtes auch andere Funktionen in der Zelle übernehmen, die durch eine Hemmung ebenfalls betroffen sein könnten, sind die viralen Faktoren Tat und TAR die bevorzugten Angriffspunkte bei der Bekämpfung von HIV und anderen Lentiviren.

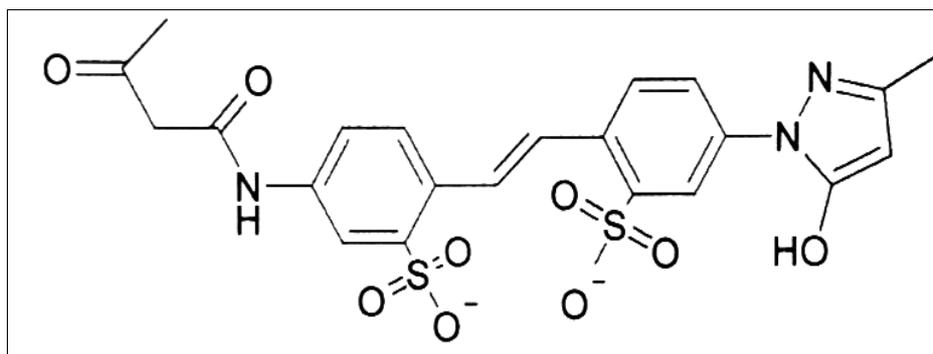


Abb. 1.14: TF53, ein Inhibitor der HIV-Tat/TAR-Bindung

TF53 ist auch unter dem Namen CGA137053 bekannt (aus: Hamy et al., 2000).

Alle Substanzen, die im Experiment ihre hemmende Wirkung gegen HIV bewiesen haben, müssen auf ihrem Weg zum Medikament oder Impfstoff in vielen klinischen Studien getestet werden, um eine Gefährdung der Patienten zu minimieren. Die meisten Wirkstoffe werden auf diesem Weg wieder verworfen, so dass nur ein geringer Teil überhaupt am Menschen getestet werden kann. Darum wird auch in den nächsten Jahren die Suche nach HIV-hemmenden Substanzen und die Untersuchung ihrer Wirkmechanismen hohe Priorität haben.

1.5 Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten strukturelle Untersuchungen am Antiterminationskomplex von EIAV Einblicke in die Wechselwirkungen der Komplexpartner EIAV-Tat, EIAV-TAR und Cyclin T1 geben.

Dazu war es zunächst notwendig, neben den bereits im Labor etablierten Reinigungen von Tat-Protein und TAR-RNA (Rosin-Arbesfeld et al., 1994; Willbold, 1993), ein CyclinT1-Protein zu exprimieren, das sich in – für die eingesetzte Kernresonanzspektroskopie geeigneten – Konzentrationen löslich reinigen lässt.

Um Wechselwirkungen der Komplexpartner auf der Ebene einzelner Aminosäuren oder Basen direkt in NMR-Experimenten beobachten zu können, war es in einem zweiten Schritt notwendig, Zuordnungen der NMR-Resonanzen zu erstellen.

Des Weiteren sollten experimentelle Bedingungen gefunden werden, unter denen sich die Komplexpartner sowohl einzeln als auch in binären oder ternären Komplexen untersuchen lassen. Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund: 1. Können binäre Interaktionen zwischen EIAV-Tat und TAR-RNA *in vitro* beobachtet werden, und welche Aminosäuren

bzw. Basen sind davon betroffen? 2. Welche Wechselwirkungen sind zwischen EIAV-Tat und Cyclin T1 zu beobachten? 3. Lassen sich Interaktionen zwischen Tat, TAR und Cyclin T1 beobachten, und welche Auswirkungen hat eine etwaige ternäre Komplexbildung auf die einzelnen Bindungspartner?

Außerdem sollte untersucht werden, ob der Inhibitor der HIV-Tat/TAR-Bindung TF53 auch an EIAV-Tat bindet und somit möglicherweise eine Hemmung des Tat/TAR-Komplexes bewirken könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Angegeben sind die Namen der Stämme, ihr Genotyp und dazugehörige Referenzen.

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>lacZYA</i> , <i>argF</i>) U169, ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, k ⁻	Jessee (1986)
<i>E. coli</i> Top10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Grant et al. (1990)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , (DE3), <i>lon</i> ⁻	Grodberg & Dunn (1988)
<i>E. coli</i> TUNER (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , <i>lacY1</i>	Novagen, Madison, USA

2.1.1 *E. coli* DH5 α und *E. coli* Top10

Zur Transformation rekombinanter Plasmide und zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die Stämme *E. coli* DH5 α und *E. coli* Top10 verwendet.

Diese Stämme zeichnen sich durch ihre hohe Transformationseffizienz aus. Das Fehlen von Restriktionsenzymen (*hsdR*) verhindert den Abbau der Plasmid-DNA. Ein Einbau des Plasmids in die chromosomale DNA ist bei diesen rekombinationsnegativen (*recA1*) Stämmen nicht möglich.

2.1.2 *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* TUNER

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden *E. coli* BL21 (DE3) und TUNER, der eine *lacY1*-Mutante von BL21 darstellt, verwendet.

Der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) zeichnet sich gegenüber *E. coli* BL21 dadurch aus, dass zusätzlich der Bakteriophage DE3 - ein λ -Derivat - als Prophage im Bakterienchromosom eingebaut ist. In das *int*-Gen von DE3 sind das für den Lactoserepressor kodierende Gen *lacI* und das Gen für die T7 RNA-Polymerase inseriert. Letzteres steht unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors und des *lacO*-Operators. Der Promotor ist durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) induzierbar, so dass nach IPTG-Zugabe die T7 RNA-Polymerase exprimiert wird. Diese transkribiert ausschließlich unter Kontrolle des T7 Promotors stehende Gene. *E. coli* BL21 (DE3) wurde daher zur Expression rekombinanter Proteine, deren Gene unter der Kontrolle des T7 Promotors und des *lacO*-Operators stehen, eingesetzt. Im *E. coli* TUNER-System ist zudem die Aufnahme von IPTG optimiert.

2.2 Plasmide

Die kommerziell erhältlichen bzw. von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellten Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Plasmide

Angegeben sind jeweils der Name des Plasmids, die selektierbare Antibiotikaresistenz, der Verwendungszweck und die Quelle.

Plasmid	Resistenz	Eigenschaft	Herkunft
pBlueskript II KS	Ap	Klonierungsvektor	Stratagene, La Jolla, USA
pET 11a	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pET 19b	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pET 16b	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA

In Tabelle 2.3 sind die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten und aus Vorarbeiten von Dr. Silke Hoffmann erhaltenen Plasmide aufgeführt. Die jeweiligen Resistenzen lassen sich von den zugrunde liegenden kommerziellen Plasmiden (vgl. Tab. 2.2) ableiten.

Tab. 2.3: Konstruierte Plasmide

Die Namen der Plasmide leiten sich vom zugrunde liegenden Vektor und dem kodierten Gen ab. Die Eigenschaften des kodierten Proteins sind aufgeführt.

Bezeichnung	Eigenschaft	Herkunft/Quelle
pBluescript	enthält <i>NdeI</i> - und <i>Bpu1102I</i> -Schnittstellen	Dr. S. Hoffmann
pET11a-hCycT(272Δ)-2A	kodiert für hCyclin (aa 1-272)	Dr. S. Hoffmann
pET11a-hCycT1_V29L	aa-Austausch V29L in hCyclin	diese Arbeit
pBluescript_eCycT1(1-272)	trägt eCyclin (aa 1-272) incl. <i>NdeI</i> - und <i>Bpu1102I</i> -Schnittstellen	Dr. S. Hoffmann
pET11a_eCycT1(1-272)	kodiert für eCyclin (aa 1-272)	Dr. S. Hoffmann
pET19b_eCycT1(1-272)	kodiert für His- <i>tagged</i> eCyclin (aa 1-272)	Dr. S. Hoffmann
pBluescript/Mini_eCyc	trägt eCyclin-Variante mit 75 aa	diese Arbeit
pET11a/Mini_eCyc	kodiert für eCyclin-Variante mit 75 aa	diese Arbeit
pETATA2E (pET16b)	kodiert für His-EIAV-Tat	Rosin-Arbesfeld et al. (1994)

2.3 Oligonukleotide

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt, die von den Firmen BioTez (Berlin-Buch) oder MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen wurden.

Tab. 2.4: Name, Sequenz und Länge der verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz	Länge
5'eCycPep	5' - GGA GGA TTT AAA AGC GGC CCC AAC AGG CTG AAA CGA ATT CGG AAT TGG AGG - 3'	51mer
3'eCycPep	5' - GGA GGA TTT AAA GTC CTG GAG CAG ATT GGC CGC CTG CTG GCG - 3'	42mer
hCycT_V29L_3'	5' - GGG TCC AGG CCA AAA CGA CG - 3'	20mer
T7 Promotor	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	20mer
T7 Terminator	5' - CAA GAC CCG TTT AGA GG - 3'	17mer
pUCseq	5' - GTT TTC CCA GTC ACG AC - 3'	17mer
pUCseq rev	5' - GGA AAC AGC TAT GAC CAT G - 3'	19mer

2.4 Nährmedien

Die Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien vor dem Autoklavieren jeweils 15 g Agar pro Liter Medium zugesetzt.

Die Sterilisation erfolgte durch 30-minütiges Autoklavieren bei 121 °C (Autoklav Typ 23, bzw. Varioklav, Melag, Berlin).

Für die Herstellung von Selektivmedien wurde den sterilisierten Medien nach Abkühlen auf etwa 50 °C steril filtrierte (0,2 µm Filter, Sartorius, Göttingen) Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

2.4.1 LB-Medium (Luria Bertani)

10 g Pepton (tryptisch verdaut)
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1000 ml H₂O

2.4.2 TB-Medium

12 g Hefeextrakt
6 g Pepton (tryptisch verdaut)
2 ml Glycerin
1,16 g KH₂PO₄
6,27 g K₂HPO₄
ad 500 ml H₂O

2.4.3 Minimalmedium M9

Dem Minimalmedium M9 nach Sambrook et al. (1989) wurde die Spurenelementlösung TS2 zugegeben (Meyer & Schlegel, 1983).

5 x M9-Medium:

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	85,5 g
KH ₂ PO ₄	15,0 g
NaCl	2,5 g
NH ₄ Cl	5,0 g

ad 1000 ml H₂O

TS2:

ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	100 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	30 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200 mg
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	20 mg
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	900 mg
Na ₂ SeO ₃	20 mg

ad 1000 ml H₂O

Zur Herstellung von 1 l Minimalmedium wurden 200 ml 5 x M9 mit 800 ml Wasser versetzt und autoklaviert. Dazu wurden folgende autoklavierte bzw. sterilfiltrierte Lösungen gegeben:

1 M MgSO ₄	2,0 ml
TS2-Lösung	2,0 ml
10 mM Fe(III)citrat	1,0 ml
50 % (w/v) Glukose	8,0 ml
1 M CaCl ₂	100 µl
0,5 % Vitamin B1	100 µl

2.5 Enzyme, Standards und Chemikalien

Enzyme, Nukleinsäurestandards, Proteinstandards und Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Biotech (Freiburg), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Gerbu (Gaiberg), GibcoBRL (Eggenstein), MBI-Fermentas (Vilna, Litauen), New England Biolabs (Schwalbach), Novagen (Madison, USA), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) bzw. Sigma (Deisenhofen) bezogen. Der Reinheitsgrad der Chemikalien war *pro analysi* (p.a) oder *reinst*.

2.6 Sonstige Materialien

Das synthetische Peptid Mini_eCyc_45 wurde von der Firma Biosyntan (Berlin) bezogen.

EIAV-TAR-RNA wurde mittels *in vitro*-Transkription von Frau Ulrike Herzing am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere (Universität Bayreuth) hergestellt und gereinigt. Die Vorgehensweise wurde von Willbold (1993) beschrieben, wobei für die in der vorliegenden Arbeit verwendete TAR-RNA als Template keine Plasmid-DNA sondern ein Oligonukleotid (5'-GCC GAC TCA GAC CGC AGA ATC TGA GTG CGG CTA TAG TGA GTC GTA TTA-3') diente.

Der HIV Tat/TAR-Inhibitor TF53 wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Klimkait und Dr. François Hamy (beide Universität Basel) zur Verfügung gestellt.

2.7 Absorptionsmessung

Absorptionsmessungen im UV-VIS-Bereich wurden mit einem Uvikon 930 Zweistrahl-Spektralphotometer (Kontron, Eching) durchgeführt. Dabei wurden für UV-Absorptionsbestimmungen Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) und für Messungen im sichtbaren Bereich Polystyrol-Halbmikroküvetten (Roth, Karlsruhe) mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet.

2.7.1 Bestimmung des Bakterientiter

Trübungsmessungen von Bakterienkulturen erfolgten bei 600 nm, wobei eine Absorptionseinheit (OD_{600}) einer Bakteriendichte von etwa 1×10^9 Zellen/ml entspricht. Als Referenzlösung wurde das entsprechende reine Nährmedium verwendet. Bei Absorptionswerten oberhalb von 0,3 OD_{600} wurde die Probe mit dem entsprechenden Nährmedium verdünnt.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm bestimmt. Als Referenzlösung diente der jeweils verwendete Puffer. Der gewählte Messbereich lag zwischen 0,1 und 0,8 Absorptionseinheiten. Lösungen, die höhere Messwerte aufwiesen, wurden entsprechend verdünnt.

Die Proteinkonzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt:

$$c = \frac{A}{d \cdot \epsilon_{280}} \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

(mit c: Konzentration [M]; A: Absorption; d: Schichtdicke der Küvette [cm] und ϵ_{280} : molarer Extinktionskoeffizient des nativen Moleküls [$M^{-1}cm^{-1}$])

Für die Konzentrationsbestimmungen wurden die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} nach Gill & Hippel (1989) aus der Aminosäurezusammensetzung des jeweiligen Proteins ermittelt.

2.7.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur näherungsweisen Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurde die Absorption der jeweiligen Lösungen bei 260 nm ermittelt. Dabei gilt im allgemeinen, dass 1 A_{260} /ml einer dsDNA-Menge von 50 $\mu\text{g/ml}$, einer ssDNA-Menge von 33 $\mu\text{g/ml}$ und einer ssRNA-Menge von 40 $\mu\text{g/ml}$ entspricht (Sambrook et al., 1989).

Zusätzlich lässt sich durch den Quotienten A_{260}/A_{280} eine Aussage über den Reinheitsgrad einer Nukleinsäure-Präparation treffen: Ein Quotient von 1,6 bis 2,0 zeigt eine hohe Reinheit der DNA- bzw. RNA-Präparation an.

Zusätzlich wurden DNA-Proben optisch mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Dabei konnte die ungefähre Konzentration der DNA-Proben durch Vergleich der Intensitäten der mit Ethidiumbromid gefärbten Probenbande mit einem Molekulargewichtstandard bekannter Konzentration ermittelt werden.

2.7.4 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der EIAV-TAR-RNA wurde über das Lambert-Beersche Gesetz (vgl. Gleichung 2.1) mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} von $457642 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

2.8 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Trennung von Proteingemischen wurden denaturierende Elektrophoresen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Dabei wurden 19 % SDS-Gele (19 % bezieht sich auf den Anteil von Acrylamid) im diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970) (vgl. Kap. 2.8.1) verwendet.

Es wurden Gele der Größe 8 cm x 10,2 cm und einer Dicke von 0,75 mm gegossen, wobei das Trenngel ca. 6 cm und das Sammelgel ca. 2 cm hoch war. Die Elektrophorese wurde in einer Mighty Small II SE Gelelektrophoresekammer (Hofer/Pharmacia, Freiburg) mit einem Power Pac 300- bzw. einem Power Pac 3000- (Bio-Rad, München) oder einem MultiDrive XL-Netzgerät (LKB Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

Nach der Färbung wurden die Gele mit dem Gel-Dokumentationssystem Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, München) dokumentiert.

2.8.1 SDS-Gele nach Laemmli

Das Trenngel bestand aus 19 % Acrylamid, 0,46 % (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 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 125 mM Tris/HCl, pH 6,8. Durch Zugabe von 10 µl TEMED und 150 µl einer 10 % (w/v) Ammonium-peroxodisulfatlösung (APS) pro 20 ml Gel-Lösung wurde die Polymerisation gestartet.

Die Elektrophorese erfolgte in 25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS bei einer konstanten Stromstärke von 24-26 mA.

2.8.2 Probenvorbereitung

Jeweils 10 µl der zu analysierenden Proteinlösung wurden vor dem Probenauftrag mit 10 µl Probenpuffer (4 x Roti-Load® (Roth, Karlsruhe), 1:2 verdünnt mit H₂O) versetzt und mindestens 5 min bei 95 °C denaturiert.

Zellpellets wurden mit 50 µl Probenpuffer versetzt und mindestens 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden 12,5 µl auf das Gel aufgetragen.

2.8.3 Proteinstandards

Als Molekulargewichtstandard wurde der "low-range" Standard von Bio-Rad (München) verwendet.

■ Bio-Rad:

Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel	97,4 kDa
Rinderserumalbumin	66,2 kDa
Ovalbumin aus Hühnereiweiß	45,0 kDa
Rinder-Carboanhydrase	31,0 kDa
Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen	21,5 kDa
Lysozym aus Hühnereiweiß	14,4 kDa

2.8.4 Coomassie-Färbung

Die Färbung der SDS-Gele wurde mit Coomassie-Blau durchgeführt. 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 % (v/v) 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.

2.9 Agarosegelelektrophorese

Je nach Volumen und Anzahl der Proben wurden Gele der Größe 25 cm x 15 cm in einer Agagel Maxi Gelkammer (Biometra, Göttingen) oder 10 cm x 6 cm in einer Mini-DNA-Sub-Cell-Gelkammer (Bio-Rad, München) gegossen. Agarose wurde in Konzentrationen von 0,8 bis 3 % (w/v) durch Aufkochen in TAE-Puffer (10 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst, mit 5 µl einer 1 % Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Agaroselösung versetzt und bei 60 °C aufbewahrt. Für analytische Gele wurde Agarose NEEO (Roth, Karlsruhe), für präparative Gele wurden *low melting* Agarosen der Firmen Biozym (Hess, Oldendorf) und FMC (Rockland, USA) verwendet.

Die Proben wurden jeweils mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (50 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylencyanol) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandards wurden *HindIII* restringierte DNA des Bakteriophagen λ (Fragmentgrößen: 23,13 kb; 9,416 kb; 6,557 kb, 4,631 kb; 2,322 kb; 2,027 kb; 0,564 kb; 0,125 kb), 100-bp-ladder Standard (MBI-Fermentas) und *MspI* verdaute pUC19-DNA (Fragmentgrößen: 0,501 kb; 0,489 kb; 0,242 kb; 0,190 kb; 0,147 kb; 0,111 kb; 0,110 kb; 0,067 kb; 0,034 kb; 0,026 kb) eingesetzt. Anoden- und Kathodenraum der Gelkammer wurden mit TAE-Puffer befüllt.

Die Elektrophorese wurde bei konstant 90 V mit einem PowerPac-3000-Netzgerät der Firma Bio-Rad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Nach einer Laufzeit von 30 bis 60 Minuten wurden die DNA-Banden durch Fluoreszenz auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem Gel-Dokumentationssystem (Gel-Doc 2000, Biometra, Göttingen) dokumentiert.

Für die präparative Gewinnung von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA daraus extrahiert (vgl. Kap. 2.12.3).

2.10 Zentrifugationen

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

- Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau) für Probenvolumina bis 2,0 ml unter Kühlung bis max. 13000 rpm.
- Kühlzentrifuge Centrikon T-124 (Kontron, Eching) für Probenvolumina bis 300 ml mit einem A 6.9 Rotor bis max. 9000 rpm unter Kühlung.
- Tischzentrifuge Universal 30 RF (Hettich, Tuttlingen) mit einem Ausschwingrotor Typ 1424A für Probenvolumina bis 50 ml und max. 5000 rpm unter Kühlung.
- Ultrazentrifuge Centrikon T-1170 (Kontron, Eching) mit einem TFT 70,38 Rotor für Volumina bis 30 ml und max. 70000 rpm unter Kühlung.

2.11 Isolierung von Plasmid-DNA

Je nach benötigter DNA-Menge und erwünschtem Reinheitsgrad wurden unterschiedliche Verfahren zur Plasmid-DNA-Isolierung eingesetzt.

2.11.1 Präparation über alkalische Lyse

Mit einer modifizierten Plasmid-Reinigungsmethode nach Birnboim & Doly (1979) konnten bis zu 5 µg Plasmid-DNA gewonnen werden.

Das Zellpellet von 5 ml einer Übernachtskultur wurde in 100 µl 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert, mit 200 µl 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS für 5 Minuten versetzt und nach Zugabe von 150 µl 3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5 für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dadurch wurden chromosomale DNA und Proteine zusammen mit SDS gefällt. Die lysierten Zellen wurden bei 4 °C abzentrifugiert (15 Minuten, > 12000 × g). Anschließend wurden 400 µl des Plasmid-DNA-haltigen Überstandes mit 1 ml vorgekühltem Ethanol versetzt und eine Stunde auf Eis gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (> 12000 × g, 30 Minuten, 4 °C) präzipitiert. Zur Entfernung von überschüssigem Salz wurde das DNA-Pellet zweimal mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen und 20 Minuten luftgetrocknet. Die trockene DNA wurde in 40 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) oder H₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.11.2 Präparation mittels Anionenaustauscherchromatographie

Zur Präparation plasmidaler DNA für Sequenzierreaktionen (20 µg Maßstab) sowie zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (100 µg Maßstab) wurden Kits von QIAGEN (QIAGEN Plasmid Mini Kit bzw. QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN, Hilden) oder Macherey-Nagel (Nukleobond AX 20 Kit und Nukleobond SpinPrep bzw. Nukleobond AX 100 Kit, Macherey-Nagel, Düren) verwendet.

Diese Verfahren beruhen auf einer Kombination von alkalischer Lyse und anschließender Fällung der chromosomalen DNA sowie der Proteine mit einer Chromatographie an einer DEAE-Anionenaustauschersäule.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (QIAGEN Plasmid Handbook, QIAGEN, Hilden bzw. Nucleobond AX, *properties and application*, Macherey-Nagel, Düren). Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 40 µl bzw. 150 µl Wasser aufgenommen.

Die Reinheit wurde durch Agarosegelelektrophorese von 4 µl in H₂O gelöster Plasmid-DNA überprüft.

2.12 Fällung und Reinigung von DNA

2.12.1 Butanolpräzipitation

Butanol als Fällungsmittel (Thomas, 1994) wurde zur Präzipitation von DNA aus Ligationsansätzen verwendet. Hierfür wurde zu dem jeweiligen Ansatz das zehnfache Volumen an n-Butanol pipettiert und so lange geschüttelt, bis keine Phasentrennung mehr sichtbar war. Die DNA wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 15000 × g präzipitiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das zurückbleibende DNA-Pellet für mindestens 30 Minuten luftgetrocknet. Die DNA wurde in 10 µl H₂O aufgenommen und konnte direkt für eine Elektroporation (vgl. Kap. 2.15.2.2) eingesetzt bzw. bei -20 °C gelagert werden.

2.12.2 Reinigung über Silikagelmembranen

DNA-modifizierende Enzyme sowie Salze konnten einfach durch den Einsatz von Säulen mit einer Silikagelmembran (QIAquick, QIAGEN, Hilden) aus der DNA-Lösung entfernt werden. Dabei konnte gleichzeitig das Volumen auf bis ca. 30 µl eingeengt werden. Die Reinigung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben (QIAquick Handbuch, QIAGEN, Hilden). Eluiert wurde mit 50 µl H₂O bzw. Pufferlösung EB (10 mM Tris/HCl, pH 8,5; QIAGEN).

2.12.3 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Abtrennung unerwünschter DNA-Spezies nach PCR oder Restriktion wurden die Ansätze einer präparativen Agarosegelelektrophorese unterzogen. Das gewünschte DNA-Fragment wurde ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (bis 10 µg DNA, QIAGEN, Hilden) zurückgewonnen. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben (QIAquick Spin Handbook, QIAGEN, Hilden), und die gereinigte DNA wurde in 50 µl H₂O oder Puffer EB (QIAGEN) aufgenommen.

2.13 Enzymatische Behandlung von DNA

2.13.1 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 5 U Enzym eingesetzt. Für eine vollständige Restriktion wurden die Ansätze mindestens 4 Stunden bzw. über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Typ BE 200, Memmert, Schwabach) inkubiert. Sollte die DNA mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdaut werden, geschah dies gleichzeitig, sofern die verwendeten Enzyme ähnliche Pufferbedingungen benötigten. Ansonsten wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym verdaut, das die niedrigere Salzkonzentration im Puffer benötigte und nach 4 Stunden wurde die Salzkonzentration der für das zweite Restriktionsenzym empfohlenen angepasst.

Nach dem Verdau wurden die Restriktionsenzyme, soweit diese hitzeempfindlich waren, durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Sollte die DNA anschließend direkt für Ligationen eingesetzt werden, wurden Puffer und Enzyme durch eine QIAquick Spinsäule entfernt. Die Vollständigkeit der Restriktion wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.13.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Zur Abspaltung von 5'-überhängenden Phosphatgruppen nach einer Restriktion wurde 1 U alkalische Phosphatase (*calf intestine phosphatase*, CIP, Boehringer, Mannheim bzw. *calf intestine alkaline phosphatase*, CIAP, MBI, Vilna, Litauen) pro µg DNA in Dephosphorylierungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,3, 1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) zugegeben. Nach 45 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde eine weitere Einheit CIAP

pro μg DNA zupipettiert und nochmals 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Enzym und Puffer wurden anschließend durch Verwendung einer QIAquick Spin Säule entfernt (vgl. Kap. 2.12.2).

2.13.3 Ligation

Etwa 50 bis 100 ng doppelt verdaute dephosphorylierte Vektor-DNA wurde im molaren Verhältnis von 1:1 oder 1:2 mit dem doppelt verdauten Insert in T4-DNA-Ligasepuffer mit T4-Ligase 1 Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 16 °C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung der Ligase (10 Minuten bei 65 °C) wurde die ligierte DNA durch Butanolfällung präzipitiert (vgl. Kap. 2.12.1) und anschließend transformiert (vgl. Kap. 2.15.1).

2.13.4 Sequenzierung

Plasmid-DNA wurde von der Firma TOPLAB/MediGenomix (Martinsried) durch Cycle-Sequencing mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs als Kettenterminatoren auf einem ABI-System sequenziert. Die Datenauswertung erfolgte mit der ABI-Prism-Software.

2.14 Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt eine selektive, enzymatische Anreicherung von DNA-Fragmenten *in vitro* (Saiki et al., 1985). Diese Methode wurde zur Mutagenese von DNA-Fragmenten sowie zum Auffinden positiver Transformanten nach Klonierungsexperimenten eingesetzt. Verwendet wurden das GeneAmp PCR 2400 System bzw. das GeneAmp PCR System 9600 von Perkin Elmer (Norwalk, USA).

2.14.1 Kolonie-PCR

Transformanten-Kolonien konnten auf erfolgreiche Klonierung ohne Präparation der plasmidalen DNA überprüft werden, indem Bakterienkolonien als DNA-Lieferant für eine PCR eingesetzt wurden. Als Primer dienten Oligonukleotide, die stromauf- bzw. stromabwärts des klonierten Fragments hybridisierten.

In einem PCR-Gefäß wurden je 0,4 μM der beiden Primer, 200 μM jedes dNTPs, 2 mM MgCl_2 , 10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50 mM NaCl, 0,08 % Nonidet P-40 und 0,4 mg BSA/ml

vorgelegt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine gut separierte Bakterienkultur von der Agarplatte mit Transformanten abgenommen und in den PCR-Ansatz eingetaucht.

Vor Beginn der PCR wurden 0,5 U Taq-DNA-Polymerase (MBI-Fermentas, Vilna, Litauen) pro 50 µl Ansatz zupipettiert. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 95 °C wurden 30 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 20 Sekunden Primerannealing bei 50 °C und Primerverlängerung bei 72 °C durchgeführt.

Anschließend wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, um zu ermitteln, ob ein DNA-Fragment angereichert worden war, dessen Größe dem klonierten Fragment entsprach.

2.14.2 Direkte PCR-Mutagenese

Mutationen in flankierenden Bereichen von DNA-Fragmenten lassen sich durch direkte PCR-Mutagenese erzeugen. Durch mutagenisierende Oligonukleotide als PCR-Primer können sowohl im 5'- als auch im 3'-Terminus unabhängig oder gleichzeitig Sequenzänderungen vorgenommen werden. In einem 50 µl Ansatz wurden 50 bis 100 ng Plasmid-DNA, je 0,4 µM der beiden Primer, 200 µM jedes dNTPs in 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 0,1 % Triton X-100 und 5 mM MgSO₄ gemischt. Die Zugabe von 3 U *Vent*-DNA-Polymerase erfolgte nach 5 min Denaturierung des DNA-Templates bei 95 °C. Standardmäßig wurden 25 Zyklen aus jeweils 30 s Denaturierung bei 95 °C, Primer-Annealing und Primer-Verlängerung durchgeführt. Die Primer wurden bei einer Temperatur, die 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 10 s pro 100 bp.

Die Berechnung des T_m-Wertes erfolgte nach der Formel:

$$T_m = 69,4 + 0,41 \cdot (\% \text{ GC-Gehalt}) - \frac{650}{\text{Oligonukleotidlänge}} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

Die Proben wurden durch Präparation des PCR-Amplifikats aus einem Agarosegel von Enzym, Puffer und Ausgangsplasmid befreit.

2.14.3 Zwei-Schritt-PCR-Mutagenese

Mit dieser Mutagenesemethode (Landt et al., 1990, modifiziert) konnten ortsspezifisch auch in der Mitte eines Gens Basen mutiert werden.

Für den ersten PCR-Ansatz wurden die Komponenten wie unter Kapitel 2.14.2 beschrieben gemischt und amplifiziert. Entweder 3'- oder 5'-Primer enthielten die gewünschten Nukleotidveränderungen. Die Orientierung des Mutageneseprimers wurde jeweils so gewählt, dass das kürzest mögliche Doppelstrang-Amplifikat entstand. Das Produkt der ersten PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese von der Plasmid-DNA getrennt, aus dem Gel präpariert und in 40 µl H₂O aufgenommen. Die zweite PCR wurde in einem 100 µl Maßstab durchgeführt, wobei das gereinigte Produkt der ersten PCR als "Doppelstrang-Primer" eingesetzt wurde. Die Reaktionsprodukte wurden erneut mittels Agarosegelelektrophorese getrennt, das Fragment der richtigen Größe aus dem Gel präpariert und in 40 µl H₂O aufgenommen. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde 1/10 des gereinigten Fragments auf einem Agarosegel analysiert.

2.15 Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Zum Übertragen von Plasmid-DNA in Bakterienzellen wurde sowohl die CaCl₂-Methode (Cohen et al., 1972) als auch die Elektroporation (Dower et al., 1988) verwendet. In Fällen, in denen nur eine geringe Transformationseffizienz nötig war, wie z. B. bei der Übertragung eines Plasmids auf einen anderen Bakterienstamm, wurde die CaCl₂-Methode eingesetzt. War dagegen eine hohe Transformationseffizienz nötig, z. B. bei der Übertragung von DNA aus Ligationsansätzen, wurden die Bakterien einer Elektrotransformation (Elektroporation) unterzogen.

2.15.1 Transformation von Bakterien mit der CaCl₂-Methode

2.15.1.1 Herstellung normal kompetenter Zellen für die CaCl₂-Methode

50 ml LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C inkubiert, die Zellen anschließend durch Zentrifugation bei 3000 × g für 10 Minuten 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 eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und in 50 µl-Aliquots geteilt. Die Zellen konnten direkt für eine Transformation eingesetzt oder bei -80 °C bis zu einem Jahr gelagert werden.

2.15.1.2 CaCl₂-Methode (modifiziert nach Hanahan, 1983)

Für die eigentliche Transformation wurden zu 50 µl kompetenten Zellen 20 bis 100 ng Plasmid-DNA pipettiert und der Ansatz 30 Minuten auf Eis gestellt. Der Hitzeschock erfolgte für 90 Sekunden bei 42 °C, gefolgt von zwei Minuten Inkubation auf Eis. Zu den Zellen wurde 1 ml SOC-Medium gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt (Certomat HK und Certomat R, Braun, Melsungen). Anschließend wurden direkt 200 µl der transformierten Bakterien sowie eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung des Ansatzes auf das jeweilige Selektivmedium ausplattiert. Die restliche Bakteriensuspension wurde durch Zentrifugation (1 Minute, 15000 × g, 4 °C) konzentriert und auf eine weitere Platte mit Selektivmedium aufgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Typ BE 200, Memmert, Schwabach) inkubiert.

2.15.2 Elektrotransformation

Mit Hilfe der Elektroporation kann sowohl Plasmid-DNA in Bakterienzellen als auch linearisierte DNA in Hefezellen hoch effizient transformiert werden.

2.15.2.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Für die Präparation elektrokompenter Zellen wurde 1 l LB-Medium mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 bei 37 °C geschüttelt (200 rpm). Die Zellen wurden in vorgekühlten Zentrifugenbechern pelletiert (15 Minuten, 2000 × g, 4 °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) Glycerin) 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 × 10¹⁰ Zellen/ml) und in 40 µl-Aliquots geteilt. Die Zellen konnten direkt für eine Elektroporation eingesetzt oder bei -80 °C bis zu einem Jahr gelagert werden.

2.15.2.2 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 5 bis 100 ng Plasmid-DNA in 2 µl H₂O in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (0,1 cm, Bio-Rad, München) vorgelegt. 40 µl elektrokompente Zellen wurden zugegeben und der Ansatz wurde 2 Minuten auf Eis inkubiert. Die Küvette

wurde dann in den vorgekühlten Elektroporatorschlitten eingesetzt und in die Schockkammer des Elektroporators (*E. coli* Pulser, Bio-Rad, München) eingeführt. Der Puls erfolgte mit 1,8 kV. Die Bakterien wurden sofort mit 1 ml LB-Medium vermischt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) für eine Stunde inkubiert. Die elektrotransformierten Zellen wurden wie bei der Transformation nach der CaCl₂-Methode (vgl. Kap. 2.15.1.2) beschrieben auf Platten mit Selektivmedium transferiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.16 Kultivierung von *E. coli*

2.16.1 Bakterienanzucht

10 ml LB- oder M9-Medium wurden mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Angeimpft wurde mit einer gut separierten Bakterienkolonie, die mit einer sterilen Impföse vorsichtig von der Agarplatte entnommen wurde, oder mit 50 µl einer Dauerkultur. Die Kultur wurde über Nacht - wenn nicht anders vermerkt - bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

2.16.2 Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden durch Mischen von 850 µl einer Übernachtskultur mit 150 µl sterilem Glycerin (87 % (v/v)) hergestellt. Die Kulturen wurden bei -80 °C aufbewahrt.

2.16.3 Induktionsversuche

Vor der Anzucht von größeren Mengen an Bakterien wurden von jedem Bakterienstamm mit dem gewünschten Expressionsplasmid Induktionsversuche durchgeführt. Dazu wurden 50 ml LB-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben (mit Schikanen) mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen, mit einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Bakterienstammes auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,1 angeimpft und bei der jeweiligen Temperatur unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 wurde die Bakterienkultur durch Zugabe von 1-2 mM IPTG induziert. Die Proteinexpression wurde durch Probenentnahme vor und stündlich nach der Induktion durch Gelelektrophorese (vgl. Kap. 2.8) überprüft.

2.16.4 Zellkultivierung

Die Fermentation der Expressionsstämme zur Gewinnung rekombinanter Proteine erfolgte im 7 l Maßstab im Fermenter oder mit 1 bis 3 l Schüttelkultur im Schüttelinkubator. 5 ml Medium mit Ampicillin wurden mit 50 µl (LB Medium) bzw. 100 µl (M9 Medium) einer Dauerkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die 5 ml Kultur wurde zu 250 ml Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 7 l Medium mit Antibiotika wurden mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,2 inokuliert und mit 3 l/min Druckluft, 300 rpm (Fermenter) bzw. 160 rpm (Schüttelkultur) bei 37 °C inkubiert. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7-1,0 wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Bei Kultivierung im Fermenter wurde die Luftzufuhr auf 7 l/min und das Rührwerk auf 700 rpm hochgeregelt. Vier bis sechs Stunden nach der Induktion wurden die Zellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 6.000 x g und 4 °C geerntet und das Nasszellgewicht bestimmt. Die Zellpellets wurden sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C eingefroren. Die Überexpression des Zielproteins wurde durch Gelelektrophorese von vor und stündlich nach der Induktion entnommener Aliquots überprüft.

2.17 Proteinreinigung

Alle für die Proteinreinigung eingesetzten Puffer wurden vor ihrem Einsatz filtriert (0,45 µM Cellulose-Acetat-Filter; Sartorius AG, Göttingen) und entgast (Saugflasche 500-2000 ml, Vacuubrand Membranpumpe MZ2).

2.17.1 Zellaufschluss

Es wurde eine 20%ige (w/v) Zellsuspension im jeweiligen Lysispuffer hergestellt und - falls nicht anders beschrieben - mindestens 30 min unter Rühren auf Eis gehalten. Die Suspension wurde dreimal je 30 s mit Ultraschall behandelt (Nadelsonde 40T, 120 Watt) und zwischen den Ultraschallbehandlungen je 10 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde zur Abtrennung von Zelltrümmern 45 min bei 160.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Schwebeteilchen wurden durch Filtration durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) entfernt.

2.17.2 Metallionenaffinitätschromatographie an Chelating-Sepharose

Für die denaturierende Reinigung von EIAV-Tat und die native Reinigung von His-eCycT1 wurde eine Metallionenaffinitätschromatographie (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC) an Chelating-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt.

2.17.2.1 Reinigung von EIAV-Tat

Alle Lösungen wurden mit einer P1-Pumpe (Pharmacia) auf eine 30 ml Chelating-Sepharose gepumpt (1-2 ml/min).

Die Zellen wurden für den Zellaufschluss bei Raumtemperatur über Nacht in Bindungspuffer gerührt. Nach 45-minütiger Zentrifugation bei $160.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde der Überstand direkt auf die Chelating-Sepharose aufgebracht. Diese war zuvor mit 150 ml H_2O gespült, durch 100 ml Beladungspuffer mit NiSO_4 konditioniert und schließlich mit 100 ml Bindungspuffer äquilibriert worden. Nach dem Probendurchlauf wurde mit weiteren 100 ml Bindungspuffer gespült und mit 100 ml Waschpuffer unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Die Elution des zu reinigenden EIAV-Tat erfolgte durch Spülen mit 90-120 ml Elutionspuffer. Das Eluat wurde viermal gegen 10 mM HCl dialysiert und lyophilisiert. Dieses His-tagged EIAV-Tat wurde mittels Bromcyan gespalten (vgl. Kap. 2.17.6), nach der Lyophilisation (vgl. Kap. 2.17.7) in ca. 50 ml Bindungspuffer aufgenommen und ein zweites Mal auf die frisch konditionierte Chelating-Sepharose aufgetragen, um eine Trennung der Bromcyan-Spaltprodukte zu erreichen. Das wt-EIAV-Tat eluiert dabei sowohl im Probendurchlauf als auch beim Spülen mit Bindungspuffer. Ungespaltene Protein eluiert erst beim Spülen mit Elutionspuffer und konnte so einzeln fraktioniert und dann einer weiteren Spaltung unterzogen werden.

Das gereinigte EIAV-Tat wurde schließlich nach erneuter Dialyse und Lyophilisation im gefriergetrockneten Zustand bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Chelating-Sepharose wurde durch Spülen mit Regenerationspuffer von restlichem Protein und NiSO_4 befreit und ebenfalls bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

- **Beladungspuffer:** 50 mM NiSO_4
- **Bindungspuffer:** 20 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM Imidazol; 6M Guanidin/HCl; pH 7,9
- **Waschpuffer:** 20 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 60 mM Imidazol; 6M Guanidin/HCl; pH 7,9

- **Elutionspuffer:** 20 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 1 M Imidazol; 6 M Guanidin/HCl; pH 7,9
- **Regenerationspuffer:** 20 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 0,1 M EDTA; pH 7,9

2.17.2.2 Reinigung von His-eCyc

Der Zellaufschluss erfolgte - wie in Kap. 2.17.1 beschrieben - in Aufschlusspuffer.

Die Reinigung wurde an einem ÄKTApurifier10-System (Amersham Biotech, Freiburg) durchgeführt.

Die Chelating-Sepharose wurde zunächst mit 4 Säulenvolumen (column volume, CV) H₂O gewaschen, mit 5 CV Beladungspuffer konditioniert und mit 3 CV Bindungspuffer äquilibriert. Im Anschluss an die Zentrifugation (160.000 × g, 4 °C, 45 min) wurde der Überstand auf die Säule aufgetragen und diese mit 3 CV Bindungspuffer gespült. Danach wurde mit 5 CV Waschpuffer gewaschen und schließlich mit einem Gradienten von 0-100 % Elutionspuffer gegen 100-0 % Waschpuffer über 3-5 CV eluiert. Die Fraktionen, in denen His-eCyc enthalten war, wurden gepoolt und gegen NMR-Puffer dialysiert (vgl. Kap. 2.17.9). Die Säule wurde - wie in Kap. 2.17.2.1 beschrieben - regeneriert.

- **Aufschlusspuffer:** 20 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM Imidazol; 5 mM 2-Mercaptoethanol; 2 mg/ml Benzamidin; 5 µl/ml 0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 0,2 mg/ml Lysozym; 0,2 mg/ml DNaseI; 0,5 % TritonX-100; Protease-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette/100ml; EDTA-frei; Roche, Mannheim); pH 7,9
- **Beladungspuffer:** 50 mM NiSO₄
- **Bindungspuffer:** 20 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM Imidazol; 5 mM 2-Mercaptoethanol; pH 7,9
- **Waschpuffer:** 20 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 60 mM Imidazol; 5 mM 2-Mercaptoethanol; pH 7,9
- **Elutionspuffer:** 20 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 1 M Imidazol; 5 mM 2-Mercaptoethanol; pH 7,9

2.17.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Butyl-Sepharose

Die Proteinreinigung über die HIC wurde an Butyl-Sepharose durchgeführt, da sich dieses Material in Vorversuchen mit hCycT1 als geeignet erwies.

Als Pump- und Detektionssystem wurde das ÄKTApurifier 10-System (Amersham Biotech, Freiburg) bzw. ein Kontron HPLC-System (Kontron, Eching) eingesetzt (3 ml/min).

Die Zellen wurden in Aufschlusspuffer lysiert, und der Rohextrakt wurde einer Ammoniumsulfat-Fällung (vgl. Kap. 2.17.5) unterzogen. Das Proteinpellet wurde in 20-50 ml Puffer A gelöst und auf die - zuvor mit jeweils 10 CV H₂O, Puffer B und Puffer A äquilibrierten - Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 5 CV Puffer A gespült und nicht gewünschte Proteine über einen Gradienten von 0-100 % Puffer B eluiert. Über einen daran anschließenden Gradienten von 0-100 % Puffer C konnte das zu reinigende Cyclin in Fraktionen gesammelt werden, deren Zusammensetzung mittels einer SDS-Gelelektrophorese (vgl. Kap. 2.8) überprüft wurde. Die fraglichen Fraktionen wurden gepoolt und gegen NMR-Puffer dialysiert (vgl. Kap. 2.17.9). Da Cyclin T1 weder einer Gefriertrocknung noch Sauerstoff-Einfluss ausgesetzt werden darf, wurde die Proteinlösung in einer Amicon-Kammer konzentriert (vgl. Kap. 2.17.10), in Portionen zu jeweils 2-8 ml in luftdicht abgeschlossenen Gläschen mit Stickstoff begast und schließlich über mehrere Wochen bei 4 °C gelagert.

- **Aufschlusspuffer:** 50 mM Tris/HCl; 2 mM Dithiotreitol (DTT); 2 mg/ml Benzamidin; 5 µl/ml 0,1 M PMSF; 0,2 mg/ml Lysozym; 0,2 mg/ml DNaseI; Protease-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette/100ml; EDTA-frei; Roche, Mannheim); pH 8,0
- **Puffer A:** 50 mM Tris/HCl; 250 mM (NH₄)₂SO₄; 4 mM DTT; pH 8,0
- **Puffer B:** 50 mM Tris/HCl; 4 mM DTT; pH 8,0
- **Puffer C:** 50 mM Tris/HCl; 30 % (v/v) Isopropanol; 4 mM DTT; pH 8,0

2.17.4 Kationenaustauscherchromatographie an Heparin-Sepharose

Die Kationenaustauscherchromatographie erfolgte an Heparin-Sepharose-Säulen mit Hilfe eines ÄKTApurifier10 Systems (Amersham Biotech, Freiburg).

Die zuvor mit 10 CV H₂O gespülte Säule wurde mit mindestens 7 CV Bindungspuffer äquilibriert (Flussraten 0,5 bis 1,5 ml). Nach dem Zellaufschluss (vgl. Kap. 2.17.1) in Aufschlusspuffer und 45 min Zentrifugation bei 160.000 × g und 4 °C erfolgte der Probenauftrag. Proteine, die nicht an die Säule binden, wurden mit 5-10 CV Bindungspuffer von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 bis 100% Elutionspuffer über 12-20 CV. Es wurde mit weiteren 5 CV Elutionspuffer nachgespült. Fraktionen, in denen das zu reinigende Protein erwartet wurde, wurden mittels SDS-Gelelektrophorese (vgl. Kap. 2.8) untersucht, schließlich gepoolt und gegen den entsprechenden NMR-Puffer dialysiert (vgl. Kap. 2.17.9).

- **Aufschlusspuffer:** 20 mM Tris/HCl; 0,4 mg/ml Lysozym; 0,02 mg/ml DNaseI; Protease-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette/100ml; EDTA-frei; Roche, Mannheim); pH 8,0
- **Bindungspuffer:** 20 mM Tris/HCl; 300 mM NaCl; pH 8,0
- **Elutionspuffer:** 20 mM Tris/HCl; 2 M NaCl; pH 8,0

2.17.5 Ammoniumsulfat-Fällung

Nach dem Zellaufschluss wurde der Rohextrakt auf Eis gerührt und tropfenweise mit einer bei 0 °C gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (pH 8,0) versetzt, bis der gewünschte Anteil an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erreicht war. Es wurde 20 Minuten weiter gerührt. Durch Zentrifugation ($6000 \times g$, 4 °C, 20 min) wurden die gefällten Proteine pelletiert und der Überstand eventuell weiteren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällungen unterzogen. Das Proteinpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.17.6 Bromcyanspaltung

Bromcyan spaltet Proteine selektiv auf der carboxyterminalen Seite von Methionin (Gross, 1967). In einem Rundkolben wurde lyophilisiertes His-EIAV-Tat in 0,1 M HCl gelöst (ca. 10 mg/ml) und ca. 0,2 g/ml festes BrCN zugegeben. Die Lösung wurde im lichtdicht verschlossenen Kolben über Nacht gerührt und nach der Spaltung lyophilisiert (vgl. Kap. 2.17.7).

2.17.7 Lyophilisation von EIAV-Tat

Für die Gefriertrocknung von EIAV-Tat wurde es in Lösung (10-200 ml) zunächst in einem Rundkolben in flüssigen Stickstoff getaucht und durch Schwenken schockgefroren. Der Kolben wurde direkt an die Gefriertrocknungsanlage (CHRIST alpha 1-4) angeschlossen und das Protein über Nacht lyophilisiert. Die getrockneten Proteine wurden bei 4 °C gelagert.

2.17.8 TCA-Fällung

Proteinproben, die Guanidin/HCl enthielten und in einer SDS-PAGE untersucht werden sollten, wurden vor der Gelelektrophorese mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurden zu 50 µl Probe 950 µl H_2O und 200 µl 50 % TCA gegeben. Der Ansatz wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten zentrifugiert ($15.000 \times g$, 4 °C). Der Überstand

wurde abpipettiert und das Pellet in 20-40 μ l Probenpuffer (4 x Roti-Load[®] (Roth, Karlsruhe), 1:2 verdünnt mit H₂O) aufgenommen.

2.17.9 Dialyse von Proteinlösungen

Zur Dialyse von Proteinlösungen wurden diese in Spectra/Por-Dialyseschläuche mit 1 bis 3,5 kDa Molekulargewicht-Ausschlussgrenze (Spectrum, Houston, USA) gegeben und mindestens dreimal gegen den jeweiligen Puffer bei 4 °C dialysiert.

2.17.10 Konzentration von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von 10-200 ml Proteinlösung erfolgte auf Eis in Ultrafiltrationskammern (Amicon, Witten) unter Stickstoff. Die Ausschlussgrenze der Membranen (YM-3, Amicon, Witten) betrug 3 kDa.

Für die Konzentration von weniger als 10 ml großen Proben wurden diese in Centrikon-Gefäßen (Millipore) mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa zentrifugiert (Hettich, EBA 20).

2.18 CD-Spektroskopie

UV-Circulardichroismus-Spektren wurden mit einem J 810 S Spektrometer (JASCO International, Tokyo, Japan) aufgenommen. Es wurden verschiedene Küvetten (Hellma, Müllheim) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration verwendet.

Die Schlitzweite betrug 1 nm, die Zeitkonstante 1 s, die Auflösung der Datenpunkte 0,2 nm und die Aufnahmegeschwindigkeit 20 bis 50 nm/min. Der Wellenlängenbereich betrug 260 bis 185 nm. Bei größeren Schichtdicken wurde nur bis 190, 195 oder 200 nm gemessen. Datenpunkte, bei denen das Hochspannungssignal des Detektors > 600 V war, wurden verworfen. Es wurden 8 Spektren akkumuliert und gemittelt. Pufferspektren wurden unter gleichen Bedingungen aufgenommen und subtrahiert. Die Sensitivität betrug \pm 100 mdeg, die gemessenen Elliptizitäten lagen im Bereich von \pm 30 mdeg. Die Umrechnung der gemessenen Elliptizität in die mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest erfolgte nach Gleichung 2.3 (Schmid, 1989).

$$[\theta]_{MRW} = (10^5 \cdot \theta) / (c \cdot d \cdot N) \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

$[\theta]_{MRW}$:	mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest [$\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$]
θ :	gemessene Elliptizität [mdeg]
c :	Proteinkonzentration [μM]
d :	Schichtdicke der Küvette [cm]
N :	Zahl der Aminosäuren im Protein

2.19 NMR-Spektroskopie

2.19.1 Probenvorbereitung

Lyophilisiertes EIAV-Tat wurde bis zu einer Konzentration von 500 μM direkt im jeweiligen Puffer aufgenommen. Bei höheren Konzentrationen wurde das Protein zunächst in 200 mM K-Phosphat-Puffer aufgenommen und gegen den jeweiligen NMR-Puffer dialysiert, da sich durch die enthaltene Salzsäure bei schwächerer Pufferkapazität ein zu niedriger pH-Wert eingestellt hätte, der das Protein – wahrscheinlich durch falsche Faltung – irreversibel schädigt (Willbold, 1993).

Alle Proben wurden vor dem Abfüllen in NMR-Röhrchen (Norell, Landsville, USA oder Shigemi Co., Campro, Emmerich) mit 10 % (v/v) D_2O und 0,02 % NaN_3 versetzt sowie 10 Minuten bei $15000 \times g$ zentrifugiert. Die RNA- bzw. Proteinkonzentrationen wurden durch Absorptionsmessung bei 260 bzw. 280 nm bestimmt (vgl. Kap. 2.7.2 und 2.7.4).

2.19.2 Allgemeine Messbedingungen

Alle NMR-Experimente wurden an einem Bruker DRX600-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) mit einem inversen Vierfachresonanz-Probenkopf mit Dreiaachsen-Gradienten oder an einem AMX400-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) durchgeführt.

Die Aufnahme aller Spektren erfolgte im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion in allen Zeitdimensionen unter Verwendung der *States*-TPPI Methode (Marion et al. 1989a, 1989b). Die Eichung der ppm-Skala erfolgte für ^1H durch den externen Standard 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS), für ^{15}N indirekt über das Frequenzverhältnis der Nullpunktfrequenz ($\omega_{\text{N}}/\omega_{\text{H}} = 0,101329051$; Edison, 1994). Die Temperatur wurde durch eine BVT3000 Kontrolleinheit (Bruker, Karlsruhe) reguliert.

Alle in dieser Arbeit gemessenen NMR-Experimente und deren wichtigste Daten sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst dargestellt.

Tab. 2.5: Zusammenfassung aller NMR-Experimente und ihrer Parameter

SW: sweep width (spektrale Breite); TD: time domain (Anzahl der gemessenen komplexen Datenpunkte); NS: number of scans (Anzahl der gemessenen Scans).

Experiment	Kerne	SW [Hz]	TD	NS	Pulsprogramm*
1D-Experimente					
1D- ¹ H	¹ H	9980.0-15015.0	16384	512-2048	dpgse_ks
1D- ¹ H	¹ H	9980.0	16384	512	jrsegs.ks ¹
2D-Experimente					
HSQC	¹⁵ N/ ¹ H	1337.9/7183.9	384-1024/ 1024-2048	8	fhsqcN15.ks
TOCSY	¹ H/ ¹ H	7183.9/7183.9	4096/640	32	dipsidpgse_ks
ctHSQC	¹³ C/ ¹ H	10565.2/ 8389.2	1024/2048	16	hsqcC13ct.ks
3D-Experimente					
TOCSY-HSQC	¹ H/ ¹⁵ N/ ¹ H	6009.6/1337.9/ 6009.6	128/48/1024	16	tocsyhsqc02_ks
NOESY-HSQC	¹ H/ ¹⁵ N/ ¹ H	6009.6/1337.9/ 6009.6	256/60/1024	16	nsyhsqc_ks
HNCA	¹⁵ N/ ¹³ C/ ¹ H	1337.9/4225.5/ 7183.9	64/96/1024	16	hncawg.ks
HNCO	¹⁵ N/ ¹³ C/ ¹ H	1337.9/2414.8/ 7183.9	64/96/1024	8	hnco_ks
CBCA(CO)NH	¹⁵ N/ ¹³ C/ ¹ H	1337.9/8450.9/ 7183.9	64/104/1024	16	cbcaconhwg.ks
CCONH	¹⁵ N/ ¹³ C/ ¹ H	1337.9/9960.0/ 7183.9	64/116/1024	16	cconh.ks
HNCACB	¹⁵ N/ ¹³ C/ ¹ H	1337.9/8450.9/ 7183.9	64/104/1024	16	hncacbwg.ks
HBHA(CO)NH	¹⁵ N/ ¹ H/ ¹ H	1337.9/3300.7/ 7183.9	64/128/1024	16	hbhaconhwg.ks
HCCONH	¹⁵ N/ ¹ H/ ¹ H	1337.9/3300.7/ 7183.9	64/128/1024	16	hconh.ks
HCCHCOSY	¹ H/ ¹³ C/ ¹ H	3300.7/5281.8/ 7183.9	160/64/1024	16	hchcosy.ks
HNHA	¹ H/ ¹⁵ N/ ¹ H	4200.9/1337.9/ 7183.9	160/64/1024	16	hnha.ks

*Die Pulsprogramme können Schweimer (2000) entnommen werden. ¹nur bei Abb. 3.26 und Abb. 3.28

2.19.3 Prozessierung und Auswertung der Spektren

Die Prozessierung und Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit den Programmen NMR-View 5.1.3 (Johnson & Blevins, 1994) und NDEE (SpinUp Inc., Dortmund) sowie mit am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere entwickelten Programmen (Schweimer, 1997, 2000). Zur Steigerung der digitalen Auflösung wurde die Länge der FIDs typischerweise in beiden Dimensionen durch Auffüllen mit Nullen verdoppelt (einfaches zero-filling). Eine anschließende Multiplikation mit einer um $\pi/2$ oder $\pi/3$ verschobenen Sinusquadrat-Funktion als Filter reduzierte die durch das Abschneiden der FIDs bei zu kurzen Aufnahmezeiten verursachten Artefakte.

Bei der Auswertung der Spektren wurden Veränderungen der chemischen Verschiebung einzelner Resonanzen mit Pfeilen markiert. Diese Pfeile zeigen bei den 1D-Imino-Spektren der TAR-RNA mit großer Wahrscheinlichkeit die tatsächlichen Veränderungen der Signale an, da sich die einzelnen Peaks nur wenig verändern. Dagegen zeigen diese Richtungspfeile bei allen anderen 1D- und HSQC- Spektren nur die wahrscheinlichen Verschiebungen an, da die veränderte Form des Proteins nicht erneut zugeordnet wurde. Bei der Angabe der Pfeile wurde in Annäherung die am nächsten gelegene Verschiebung ausgewählt. Teilweise konnten verschiedene Spektren auch miteinander verglichen werden, so dass bei gleichen Veränderungen einer Resonanz in diesen unterschiedlichen Spektren das Signal eindeutiger einer Aminosäure zugeordnet werden konnte, wenn keine Veränderungen in der direkten Nachbarschaft dieser Resonanz gleichzeitig in beiden verglichenen Spektren auftraten.

Zur graphischen Darstellung der Spektren dienten ebenfalls die Programmpakete NDEE und NMRView 5.1.3 .

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Klonierung, Expression und Reinigung von rekombinantem Cyclin T1

Für die strukturelle Untersuchung des Antiterminationskomplexes aus EIAV war es wichtig, die einzelnen Bindungspartner in Milligramm-Mengen zu reinigen und sie in für die NMR tauglichen Konzentrationen zu lösen.

Da sowohl TAR-RNA als auch Tat-Protein bereits erfolgreich gereinigt werden konnten, sollte durch die Reinigung rekombinanter Cycline die Reihe der Bindungspartner komplettiert werden.

3.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von hCycT1_V29L

Die Reinigung des 272 Aminosäuren großen humanen Cyclin T1 wurde bereits von Frau Dr. Silke Hoffmann erfolgreich durchgeführt, so dass im Folgenden die dazu äquivalente Reinigung der Mutante hCycT1_V29L beschrieben wird, die als an EIAV-Tat bindende und aktivierende Mutante identifiziert werden konnte (Taubе et al., 2000).

3.1.1.1 Klonierung von pET11a-hCycT1_V29L

Die Mutation von Valin zu Leucin der Aminosäure 29 von hCycT1 wurde mittels Zwei-Schritt-PCR-Mutagenese (vgl. Kap. 2.14.3) eingeführt (vgl. Abb. 3.1). Als Template diente jeweils pET11a-hCyclin T1-DNA (vgl. Tab. 2.3), und im ersten Schritt wurden als Primer hCycT_V29L_3' und T7-Promotor (vgl. Tab. 2.4) eingesetzt. Im zweiten Schritt diente das entstandene Amplifikat als 5'-Primer; 3'-Primer war T7-Terminator.

Nach Gelextraktion (vgl. Kap. 2.12.3) und Restriktion mit *NdeI* und *Bpu1102I* (vgl. Kap. 2.13.1) wurde das DNA-Fragment mit einem ebenfalls *NdeI/Bpu1102I*-verdauten und dephosphorylierten (vgl. Kap. 2.13.2) pET11a-Vektor ligiert (vgl. Kap. 2.13.3).

Nach der Ligation wurde eine Butanol-fällung durchgeführt (vgl. Kap. 2.12.1) und schließlich das neu entstandene Plasmid pET11a-hCycT1_V29L mittels CaCl_2 -Methode (vgl. Kap. 2.15.1.2) in *E. coli* DH5 α (vgl. Kap. 2.1) transferiert. Positive Klone wurden in einer Kolonie-PCR (vgl. Kap. 2.14.1) unter Einsatz der beiden Primer hCycT_V29L_3' und T7-Promotor identifiziert. Einer dieser Klone diente schließlich der Gewinnung von Plasmid-DNA (vgl. Kap. 2.11.2), die durch Sequenzierung (vgl. Kap. 2.13.4) in ihrer Richtigkeit überprüft und welche wiederum mit Hilfe der CaCl_2 -Methode in *E. coli* BL21(DE3) (vgl. Kap. 2.1) transferiert wurde.

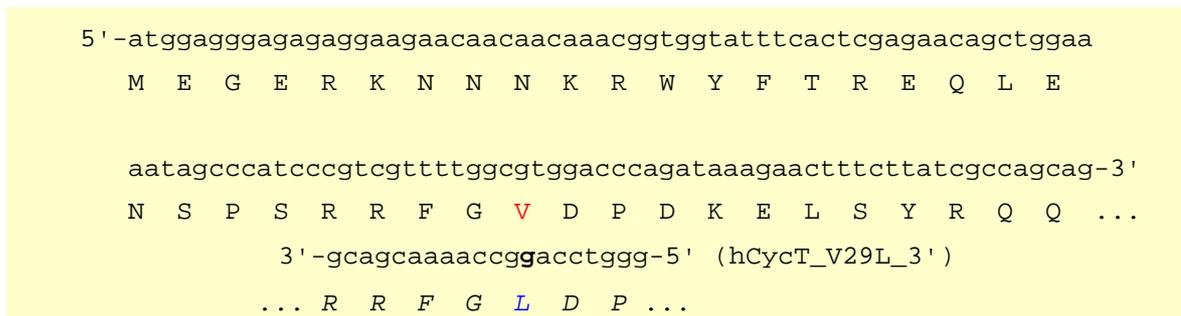


Abb. 3.1: PCR-Mutagenese zur Klonierung von hCycT1_V29L

Durch die Veränderung einer Base im Codon GTG für Valin (rot) resultiert das Codon CTG für Leucin (blau). Basen sind in Kleinbuchstaben und Aminosäuren in Großbuchstaben dargestellt. Die durch den Primer hCycT_V29L_3' eingebrachte Veränderung ist fett und die resultierende Aminosäuresequenz kursiv markiert. Die Abbildung beschränkt sich auf den aminoterminalen Bereich der ersten 40 Aminosäuren von hCycT1.

3.1.1.2 Expression von hCycT1_V29L

In Induktionsversuchen (vgl. Kap. 2.16.3), die in LB-Medium bei 37 °C und einer IPTG-Konzentration von 1 mM über einen Zeitraum von 3-4 h durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass *E. coli* BL21(DE3)/pET11a-hCycT1_V29L das mutierte hCycT1 produziert (vgl. Abb. 3.2).

Da es sich nur um eine schwache Überexpression handelte, wurden zudem Versuche mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen sowie Induktionen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, die jedoch keine Steigerung der Expressionsrate zur Folge hatten. Auch Expressionsversuche in der Hefe *Pichia pastoris*, die einer sehr aufwendigen Optimierung bedürfen, zeigten nur geringe Erfolge. Trotz einer Selektion von hoch resistenten Stämmen, in die das *hCycT1*-Gen kloniert worden war, konnte keine Expression beobachtet werden. Da aufwendige Fermentations-Versuche bzw. weitere Optimierungen zu viel Zeit gekostet hätten, und sich zudem eher die Konzentrierung und nicht die Expression von Cyclin T1 als schwierig herausstellte, wurden keine weiteren Arbeiten im *Pichia*-System durchgeführt. Außerdem wäre eine Markierung mit Isotopen im Hefesystem um ein Vielfaches teurer gewesen als in *E. coli*.

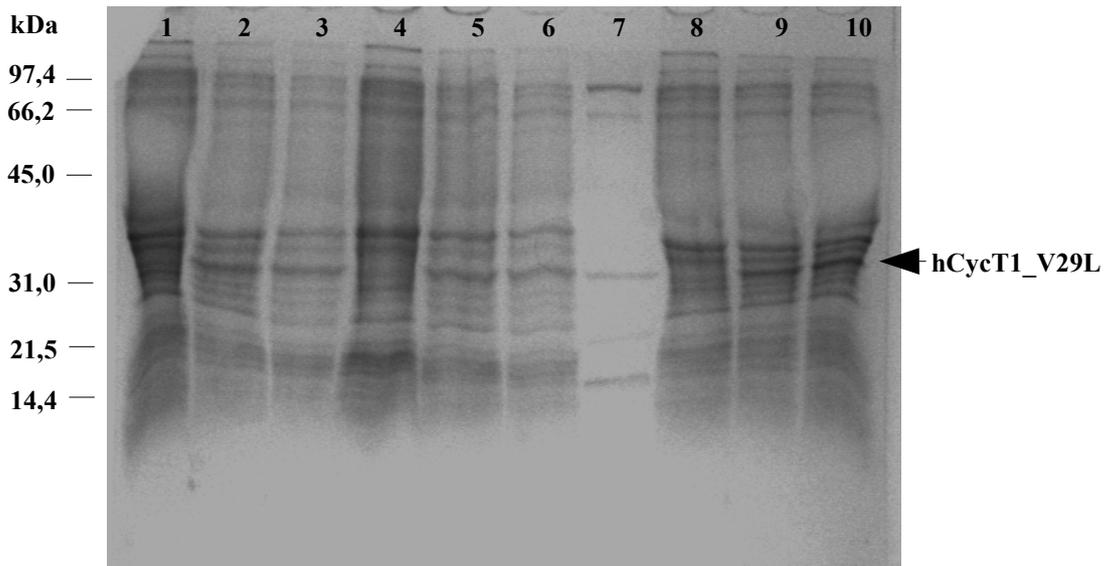


Abb. 3.2: Expression von hCycT1_V29L in *E. coli* BL21 (DE3)

Die Abbildung zeigt ein 19 % SDS-Gel, in der die Expression von hCycT1_V29L nach Induktion mit 1mM IPTG durch das Erscheinen einer zusätzlichen Proteinbande bei ca. 31 kDa zu erkennen ist (Pfeil). Bahnen 1-3: Zellrohextrakte von Klon 1 vor Induktion sowie 2 h und 3 h nach Induktion; Bahnen 4-6: wie Bahnen 1-3 von Klon 2; Bahn 7: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard (vgl. Kap. 2.8.3); Bahnen 8-10: wie Bahnen 1-3 von Klon 3.

3.1.1.3 Reinigung von hCycT1_V29L mittels HIC

Die Reinigung von hCycT1_V29L wurde mit einer Ammoniumsulfat-Fällung (vgl. Kap. 2.17.5) und einer darauf folgenden Butyl-Sepharose (vgl. Kap. 2.17.3) durchgeführt. Dabei eluierte das Protein innerhalb des zweiten Gradienten bei ca. 10 % Isopropanol (vgl. Abb. 3.3). Die einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE (vgl. Abb. 3.4) untersucht, und diejenigen, die sauberes hCycT1_V29L enthielten, wurden gepoolt und über Nacht gegen Dialyse-Puffer (10 mM K-Phosphat, 2mM Dithiotreithol (DTT), pH 8,0) dialysiert (Ausschlussgrenze: 3,5 kDa). Bei einer zweiten Dialyse wurde die Probe auf einen pH von 6,4 eingestellt (Puffer: 10 mM K-Phosphat, 2 mM DTT, pH 6,4), da dieser für die NMR-Versuche mit Tat-Protein und TAR-RNA geeignet ist.

Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung in einer Amicon-Kammer unter Stickstoff konzentriert (vgl. Kap. 2.17.10). Dadurch konnte eine maximale Konzentration von 80-100 μ M Protein erreicht werden. Bei höheren Konzentrationen kam es selbst unter optimierten Bedingungen zum Ausfallen des Cyclins.

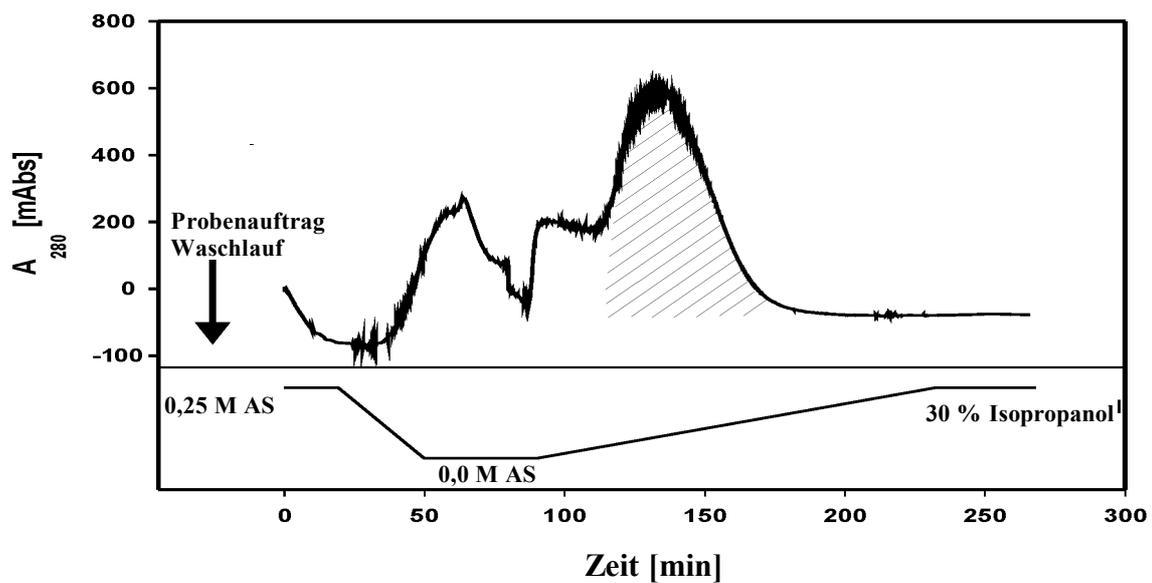


Abb. 3.3: Reinigung von hCycT1_V29L über Butyl-Sepharose.

Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil der beiden Gradienten-Läufe (vgl. Kap. 2.17.3). Der schraffierte Peak enthielt gereinigtes hCycT1_V29L (vgl. Abb. 3.4). Alle eingesetzten Puffer enthielten als Reduktionsmittel DTT, da Cyclin T1 insgesamt 6 Cysteine beinhaltet, die möglicherweise intermolekulare Disulfid-Brücken bilden und somit ein Ausfällen begünstigen könnten. AS: Ammoniumsulfat.

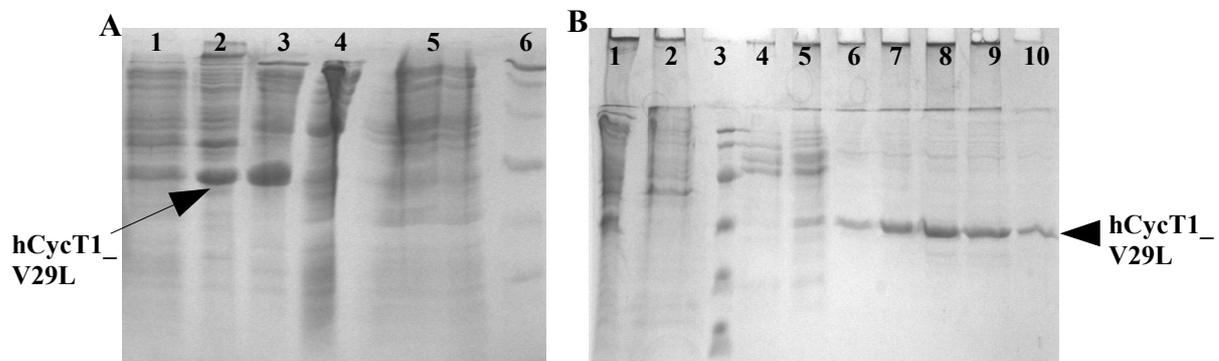


Abb. 3.4: SDS-Gele zur Analyse der Reinigung von hCycT1_V29L

Sowohl die Ammoniumsulfat-Fällung als auch die Reinigung über die Butyl-Sepharose wurden mit 19 % SDS-Gele überprüft. **A:** Nach der Ammoniumsulfat-Fällung befindet sich das hCycT1_V29L hauptsächlich im Pellet der 35%- und 45%-Fraktion; Bahn1: Zellrohextrakt nach 2,5 h Induktion mit 1 mM IPTG; Bahnen 2-5: 35 %, 45 %, 55 % Ammoniumsulfat-Pellet und Rest-Überstand nach 55%-Fällung; Bahn 6: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard. **B:** Bei der Reinigung von hCycT1_V29L mittels einer HIC bindet das Protein sehr gut an die Säule und eluiert zwischen 3 % und ca. 17 % Isopropanol; Bahn 1: Säulenauftrag (entspricht 35%- und 45%-Pellet der Ammoniumsulfat-Fällung aus Teilabbildung A); Bahn 2: Säulendurchlauf; Bahn 3: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard; Bahnen 4 und 5: Proben aus 1. Lauf ohne Isopropanol; Bahnen 6-10: eluierte Proben bei ca. 3 %, 6 %, 11 %, 13 % und 17 % Isopropanol.

3.1.2 Klonierung, Expression und Reinigung von eCycT1 und His-eCycT1

Da sich eCycT1 und hCycT1 nur in sechs Aminosäuren unterscheiden (vgl. Abb. 3.5), wurde versucht, eCycT1 ebenfalls über Butyl-Sepharose zu reinigen, was jedoch nur wenig erfolgreich war.



Abb. 3.5: Sequenzvergleich von hCycT1 und eCycT1

Der Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen zwischen den ersten 272 Aminosäuren von hCycT1 (obere Reihe) und eCycT1 (untere Reihe, Sequenz nach Bieniasz et al.; 1999a) zeigt, dass sich diese nur in sechs Aminosäuren unterscheiden. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben, wobei identische durch einen Strich verbunden und unterschiedliche Aminosäuren der gleichen Sequenzposition grün unterlegt sind. Die Zahlen am Rand geben die jeweilige Sequenzposition an.

Als optimale Expressionsbedingungen stellten sich die Induktion mit 2 mM IPTG über Nacht bei 22 °C in TB-Medium heraus. Die Ausbeute an reinem eCycT1 war sehr gering und das so gereinigte Protein zudem sehr instabil und von geringer Haltbarkeit (vgl. Abb. 3.6). Es wurden hauptsächlich nur Abbruchfragmente von eCycT1 erhalten. Dieses Phänomen trat auch bei der Lagerung von hCycT1 auf, so dass der Versuch einer Reinigung von eCycT1 mit dieser Methode abgebrochen wurde. Eine einzige gering konzentrierte Probe von eCycT1 konnte zur Messung eines CD-Spektrums eingesetzt werden (vgl. Abb. 3.8).

Weitergehende Experimente waren aber aufgrund der Instabilität des Proteins nicht möglich.

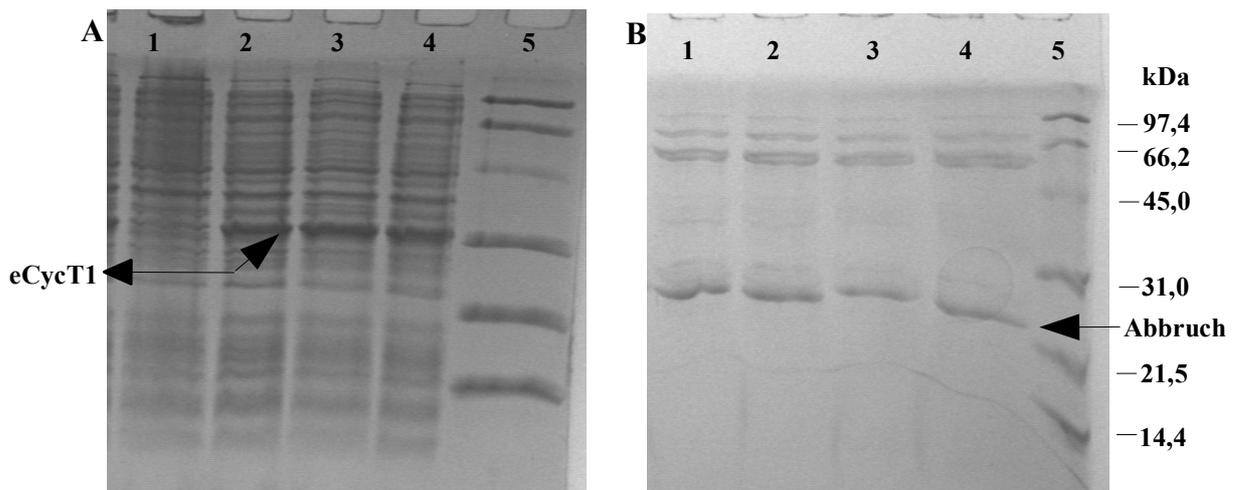


Abb. 3.6: Expression und Reinigung von eCycT1

Trotz guter Expression des Proteins konnte es über Butyl-Sepharose nur wesentlich schlechter gereinigt werden als hCycT1. Es wurden hauptsächlich Abbruchfragmente von eCycT1 erhalten.

A: Expression von eCycT1; Bahnen 1-4: Zellrohextrakte vor, 1,5 h, 2,5 h und 3,5 h nach Induktion mit 2 mM IPTG; Bahn 5: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard. **B:** Reinigung von eCycT1-Fragmenten über eine Butyl-Sepharose; Bahnen 1-4: Eluat von der HIC bei 13 %, 14 %, 15 % und 16 % Isopropanol; Bahn 5: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard.

Nachdem in Vorversuchen die Reinigung eines GST-hCycT1-Fusionsproteins nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte (pers. Mitteilung von Dr. S. Hoffmann), wurde dieser Ansatz für eCycT1 nicht verfolgt, sondern an der Klonierung von His-eCycT1 gearbeitet. Dafür wurde aus pBluescript_eCycT1(1-272) (vgl. Tab. 2.3) mittels *NdeI*- und *Bpu1102I*-Restriktion (vgl. Kap. 2.13.1) und anschließender Gelextraktion (vgl. Kap. 2.12.3) der für eCycT1 kodierende DNA-Abschnitt isoliert und mit einem ebenfalls *NdeI/Bpu1102I*-verdauten und dephosphorylierten (vgl. Kap. 2.13.2) pET19b-Vektor ligiert (vgl. Kap. 2.13.3). Nach einer Butanol-fällung (vgl. Kap. 2.12.1) wurde die pET19b/eCycT1-Plasmid-DNA in *E. coli* Top 10 elektrotransformiert (vgl. Kap. 2.15.2.2). Positive Klone wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR (vgl. Kap. 2.14.1) identifiziert, und aus einem der Klone wurden größere Mengen Plasmid-DNA präpariert (vgl. Kap. 2.11.2). Diese wurde mit der CaCl_2 -Methode (vgl. Kap. 2.15.1.2) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. In Induktionsversuchen (vgl. Kap. 2.16.3) wurden Klone identifiziert, die His-eCycT1 bei 37 °C in LB-Medium und einer IPTG-Konzentration von 1 mM in 3-4 h überexprimierten und von denen einer für die Expression (vgl. Kap. 2.16.4) und Reinigung des Proteins ausgewählt wurde.

Die Reinigung erfolgte an Chelating-Sepharose (vgl. Kap. 2.17.2). His-eCycT1 konnte auf diese Weise zu ca. 90 % rein gewonnen werden (vgl. Abb. 3.7). Die Fraktionen, die His-eCycT1 enthielten, wurden gepoolt und gegen NMR-Puffer (50 mM K-Phosphat, 4 mM Na-Dithionit, pH 6,4) dialysiert (vgl. Kap. 2.17.9). Im Anschluss an die Dialyse folgte die Konzentration der Proteinlösung in einer Amicon-Kammer (vgl. Kap. 2.17.10). Auch das His-tagged eCycT1 konnte jedoch nur bis zu einer Konzentration von ca. 80 μM in Lösung gehalten werden.

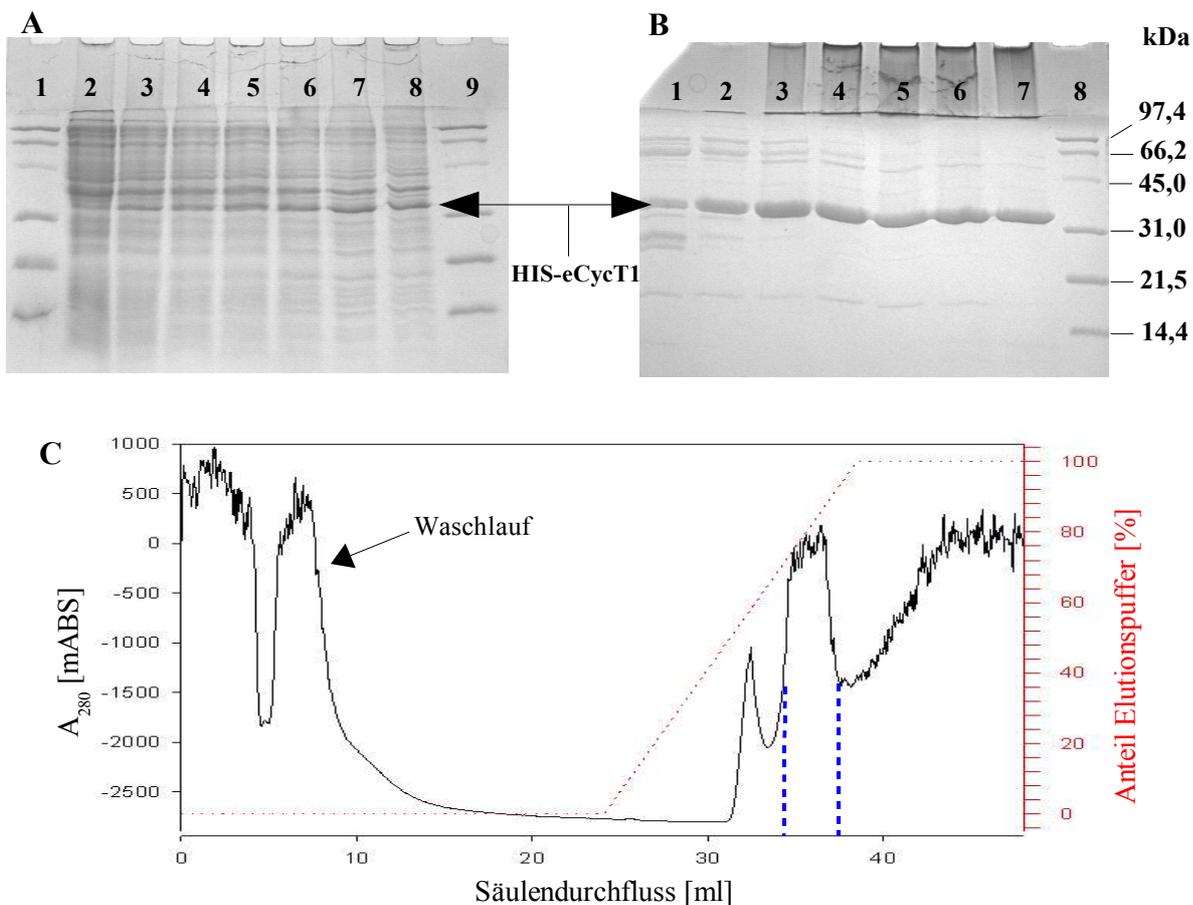


Abb. 3.7: Expression und Reinigung von His-eCycT1

Nach Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) wurde die Reinigung von His-tagged eCycT1 an einer Chelating-Sepharose durchgeführt (vgl. Haupttext). **A:** Kontrolle der Expression von His-eCycT1 in *E. coli* BL21(DE3) auf einem 19 % SDS-Gel; Bahnen 1 und 9: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard; Bahnen 2-8: Zellrohextrakte vor Induktion, 1 h, 2 h, 3 h, 3,5 h, 4 h und 4,5 h nach Induktion mit 1 mM IPTG. **B:** Kontrolle der Reinigung von His-eCycT1 über Chelating-Sepharose (19 % SDS-Gel); Bahnen 1-7: Eluat bei 700 mM, 730 mM, 760 mM, 790 mM, 820 mM, 840 mM und 870 mM Imidazol; Bahn 8: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard. **C:** Reinigung von His-eCycT1 über Chelating-Sepharose. Die gepoolten Fraktionen lagen innerhalb der blau gestrichelten Markierung.

Die Abspaltung des Histidin-Anhanges war – möglicherweise aufgrund der Faltung des Proteins – nicht möglich. Außerdem konnte das His-eCycT1 nicht über längere Zeit in Lösung aufbewahrt werden ohne auszufallen, so dass strukturelle Untersuchungen am ungebundenen und im Komplex an Tat oder TAR gebundenen Protein nicht möglich waren.

3.1.3 Erste strukturelle Charakterisierung von Cyclin T1

Die Untersuchung des rekombinant exprimierten Cyclin T1 mit CD- und 1D-NMR-Spektroskopie sollte Aussagen über dessen Sekundärstrukturelemente geben können.

Unter den hier erreichten Lösungskonzentrationen des Cyclin T1 (vgl. Kap. 3.1.1.3) waren jedoch zunächst nur 1D-NMR-Experimente möglich, da für 2D- und 3D-Experimente ohne einen Kryoprobekopf, der nicht zur Verfügung stand, eine Konzentration von > 1 mM benötigt wird. Von hCycT1 wurden auch ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren gemessen, die aber eine sehr schlechte Dispersion zeigten, so dass sie keine neuen strukturellen Daten liefern konnten.

3.1.3.1 CD-spektroskopische Untersuchungen

Für die Analyse der Sekundärstruktur von rekombinantem Cyclin T1 wurden Fern-UV CD-Spektren aufgenommen (vgl. Abb. 3.8).

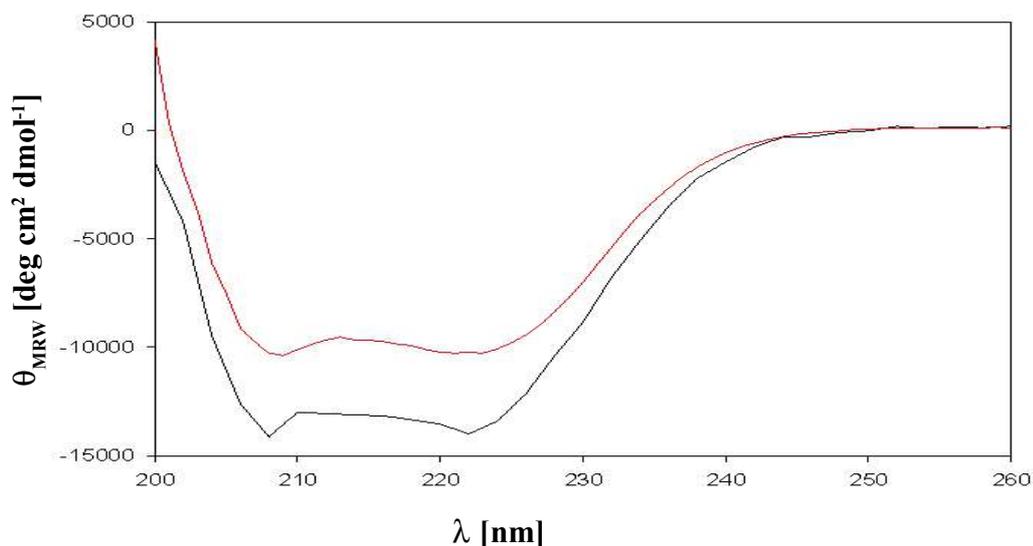


Abb. 3.8: CD-Spektren von eCycT1 und hCycT1_V29L

Die Proteine wurden in NMR-Puffer (5 mM Tris/HCl, 2 mM DTT, pH 8,0) mit einer Konzentration von 20 μM in einer 0,1cm-Küvette bei 20 °C gemessen. Es sind die für α -helikale Proteine typischen Minima bei 208 und 222 nm zu erkennen. Es wurden acht Spektren akkumuliert. Schwarz: eCycT1; Rot: hCycT1_V29L.

Die CD-Spektren beider Proteine zeigen zwei deutliche Minima bei 208 und 222 nm, was darauf hinweist, dass die rekombinanten eCycT1 und hCycT1_V29L genauso wie Cyclin H (vgl. Kap. 1.3.2) hauptsächlich aus α -helikalen Strukturelementen bestehen. Alle weiteren Untersuchungen wurden aufgrund der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Instabilität von eCycT1 mit hCycT1_V29L durchgeführt.

3.1.3.2 1D-¹H-NMR-Spektren

Da die CD-spektroskopischen Experimente bereits gezeigt hatten, dass rekombinantes hCycT1_V29L hauptsächlich α -helikal ist, sollte dieses Ergebnis auch im Einklang mit den NMR-Experimenten stehen (vgl. Abb. 3.9). Dabei ist vor allem der Bereich zwischen 6 und 10 ppm hilfreich. Dieser zeigt die Resonanzen der Amidprotonen. Liegen vermehrt Beta-Faltblätter vor, zeigt der Bereich eine wesentlich bessere Dispersion als bei hauptsächlich α -helikaler Struktur des Proteins.

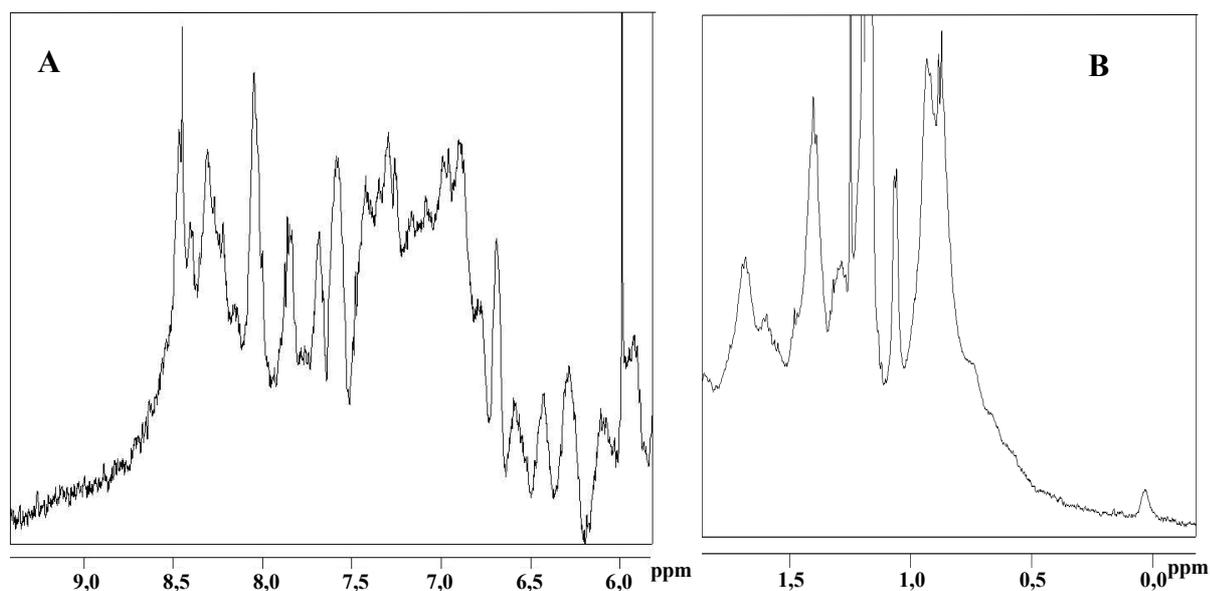


Abb. 3.9: 1D-¹H-NMR-Spektren von hCycT1_V29L

Die Spektren wurden bei 298 K und einer Konzentration von 60 μ M in einem Tris/HCl-Puffer (5 mM, 1 mM DTT, pH 8,0) aufgenommen. **A:** Die geringe Dispersion im Amidprotonen-Bereich zwischen 6,5 und 8,5 ppm deutet auf α -helikale Strukturen hin. Aufgrund des relativ hohen pH-Wertes von 8,0 sind diese Signale im Gegensatz zum restlichen Spektrum sehr niedrig. Bei einem pH-Wert von 8,0 war das Protein jedoch am stabilsten, aber auch bei 6,4 konnte der α -helikale Charakter nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.8). **B:** Der langsame Abfall des Spektrums hochfeld von 1 ppm und das Herauswachsen einzelner Peaks bei ca. 0 ppm deuten darauf hin, dass das vorliegende Protein gefaltet ist.

Da die Konzentration von hCycT1_V29L nicht wesentlich erhöht werden konnte, waren weitergehende mehrdimensionale NMR-Experimente nicht möglich. Auch die HSQC-Spektren von ¹⁵N-markiertem hCycT1 brachten aufgrund der niedrigen Konzentration und des daraus resultierenden schlechten Signal/Rausch-Verhältnis keine neuen Ergebnisse.

3.2 Untersuchungen an verkürzten Cyclin T1-Varianten

Mehrere Experimente weisen darauf hin, dass vor allem Aminosäuren der amino- bzw. der carboxyterminalen Helices von Cyclin T1 an der Tat/TAR-Bindung beteiligt sind (vgl. Kap. 1.3.2).

Da sich die Handhabung der 272 Aminosäuren großen Cyline aus Pferd und Mensch als schwierig erwiesen hatte und sich vor allem bei der Konzentration der Proteinlösungen Probleme ergaben (vgl. Kap. 3.1.1.3 und 3.1.2), sollten verkürzte Cyclin T1-Varianten auf ihre Handhabung und strukturellen Eigenschaften hin untersucht werden.

Dazu wurden sowohl ein chemisch synthetisiertes Peptid mit 45 Aminosäuren als auch ein im Labor gereinigtes Protein mit 75 Aminosäuren Länge untersucht.

3.2.1 Strukturelle Charakterisierung von Mini_eCyc_45

Das Peptid Mini_eCyc_45 wurde so konstruiert, dass es nur die notwendigsten Aminosäuren des Amino- und des Carboxyterminus beinhaltet (vgl. Kap. 1.3.2), damit es ohne Schwierigkeiten chemisch synthetisiert werden konnte (vgl. Abb. 3.10). Die beiden Stücke sind dabei über einen Linker verbunden, der aus den Aminosäuren Phenylalanin, Lysin, Serin und Glycin (FKSG-Linker) besteht. Durch die Einführung dieses Linkers sollten sowohl die carboxyterminale als auch die aminoterminal Helix stabilisiert werden (Dasgupta & Bell, 1993). Dabei diene das abschließende Glycin des Linkers als C-Cap der aminoterminalen Helix. Danach folgt ein Turn mit dem Prolin-28 und dem Asparagin-29. Letzteres dient zusätzlich als N-Cap für die carboxyterminale Helix, die ab Arginin-30 folgt.

Die chemische Synthese bietet den Vorteil, dass die Untersuchungen mit hochreinem Peptid durchgeführt werden können, ohne dass eine aufwendige Reinigung etabliert werden muss.

Das von der Firma Biosyntan hergestellte Peptid Mini_eCyc_45 wurde in einer Konzentration von 1,8 mM in NMR-Puffer (50 mM K-Phosphat, pH 6,4) gelöst und in einem 1D-¹H- und einem 2D-TOCSY-Experiment vermessen (vgl. Abb. 3.11 B und C). Die Auswertung der Spektren von Mini_eCyc_45 gibt keine Hinweise auf das Vorhandensein von Sekundär- oder Tertiärstruktur.

Auch das unter gleichen Pufferbedingungen aufgenommene CD-Spektrum (vgl. Abb. 3.11 A) deutet darauf hin, dass Mini_eCyc_45 keine ausgeprägten Strukturelemente besitzt.

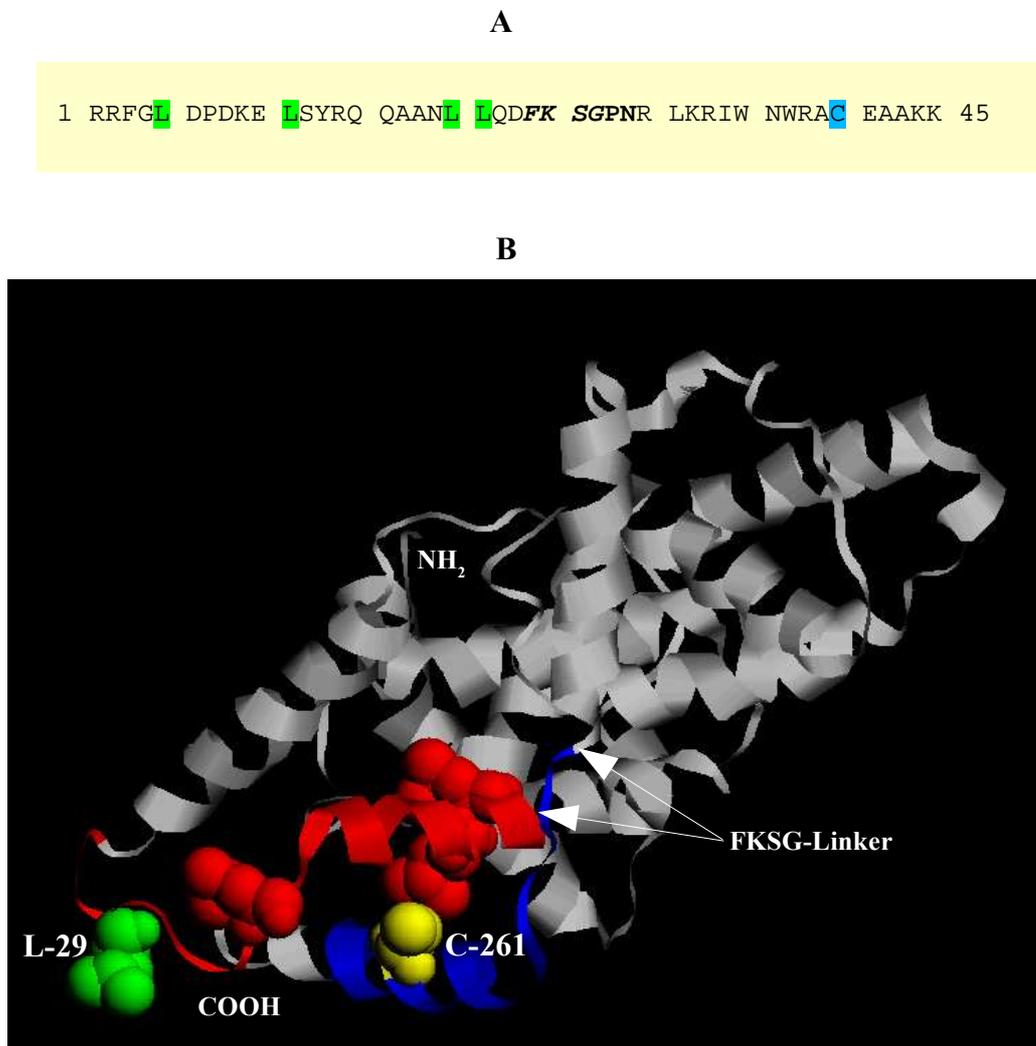


Abb. 3.10: Peptidsequenz und Modell von Mini_eCyc_45

A: Aminosäuren-Sequenz des chemisch synthetisierten Mini_eCyc_45. Farblich unterlegt sind die aminoterminalen Leucine-29, -35, -44 sowie -45 (alle grün) und das carboxyterminale Cystein-261 (blau) des 272 Aminosäuren großen eCyclin T1. Der als C-Cap fungierende FKSG-Linker ist fett und kursiv gedruckt. Die Aminosäuren Prolin-28, das zusammen mit Glycin-27 einen Turn zwischen den beiden Helices bildet sowie Asparagin-29 von Mini_eCyc-45, das als N-Cap für die carboxyterminale Helix dient, sind fett gedruckt.

B: Die Abbildung zeigt ein SWISS-Modell von Cyclin T1, das auf der Kristallstruktur von Cyclin H basiert und freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Sticht zur Verfügung gestellt wurde. Der aminoterminal Bereich mit den Leucinen (grüne und rote Kugeln) ist rot und der carboxyterminale Bereich mit C-261 (gelbe Kugeln) blau gefärbt. Die Ansatzstelle des FKSG-Linkers ist mit Pfeilen markiert.

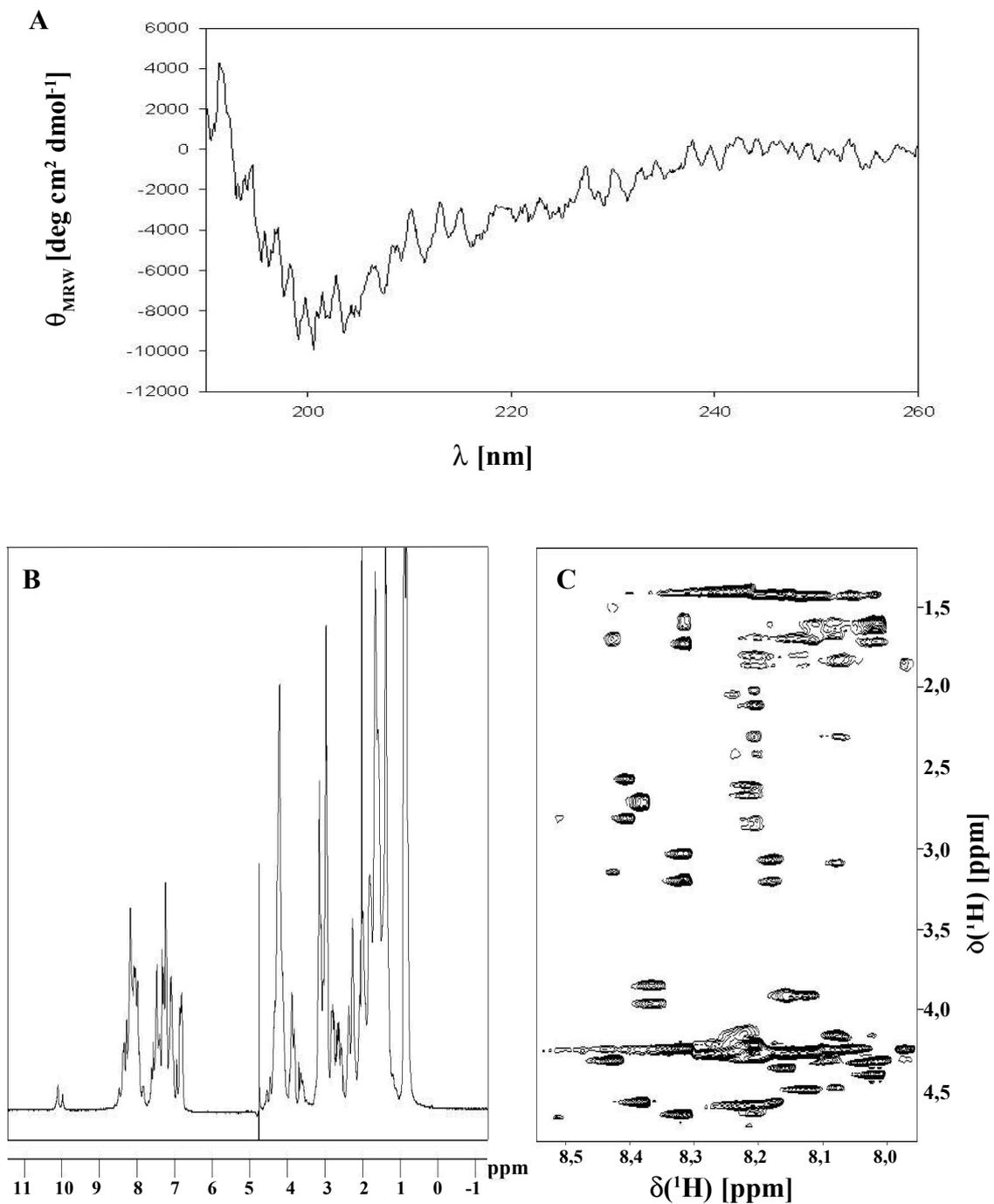


Abb. 3.11: CD- und NMR-Spektren von Mini_eCyc_45

Die Spektren zeigen, dass die Resonanzen von Mini_eCyc_45 hauptsächlich Random-Coil-Verschiebungswerte aufweisen, was auf das Fehlen von Sekundärstrukturelementen zurückgeführt werden kann. Das Peptid wurde in einem K-Phosphat-Puffer (50 mM, pH 6,4) bei 298 K und einer Konzentration von 20 μM (CD) bzw. 1,8 mM (NMR) gemessen. **A:** CD-Spektrum, gemessen in einer 0,1cm-Küvette. **B:** 1D- ^1H -NMR-Spektrum von Mini_eCyc_45. **C:** 2D-TOCSY-NMR-Spektrum des Peptids.

3.2.2 Expression, Reinigung und Charakterisierung von Mini_eCyc_75

Da ein im Labor gereinigtes Protein jederzeit neu produziert und eventuell mit Isotopen markiert werden kann, wurde ein verkürztes Cyclin T1 kloniert, gereinigt und ebenfalls strukturell untersucht. Das daraus resultierende Mini_eCyc_75 besteht aus den ersten 47 und den letzten 24 Aminosäuren des 272 Reste großen eCycT1 (vgl. Abb. 3.12). Um die Stabilität des Peptids und eine Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen zu begünstigen, wurden sowohl der gesamte Aminoterminus als auch der komplette carboxyterminale Bereich bis zum Rest 272 ausgewählt. Die Reinigung von Mini_eCyc_75 sollte zu einem wesentlich besser löslichen eCycT1-Derivat führen, in dem die hydrophoben Bereiche von Cyclin T1 nicht mehr vorhanden sind. Die Untersuchungen an Mini_eCyc_45 hatten gezeigt, dass sich ein verkürztes Cyclin T1 wesentlich besser handhaben lässt.

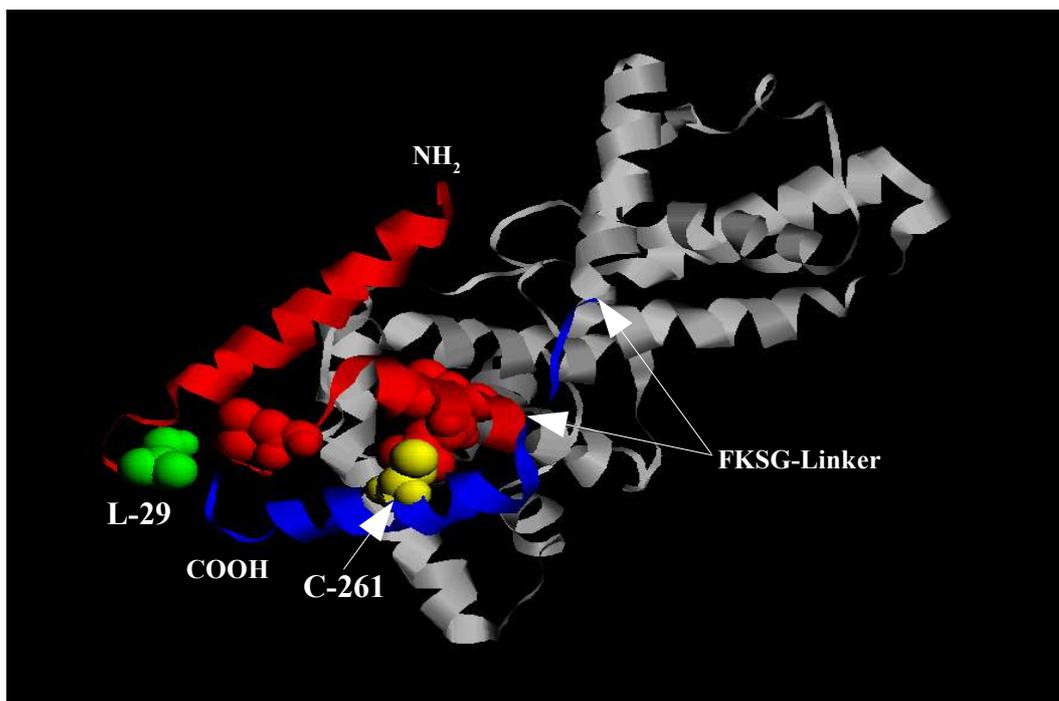


Abb. 3.12: Modell von Mini_eCyc_75

Das Modell entspricht dem in Abb. 3.10 gezeigten. In Rot ist der aminoternale Bereich und in Blau die carboxyterminale Helix eingefärbt. Die Aminosäuren Leucin-29 (grün), -35, -44, -45 (alle rot) und Cystein-261 (gelb) sind als Kugelmodell hervorgehoben. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich aminoternaler (rot) und carboxyterminaler (blau) Bereich räumlich sehr nahe kommen. Dieser Bereich wird auch als Bindungsregion im Komplex mit Tat und TAR-RNA postuliert (vgl. Kap. 1.3.2). Deshalb wurden die beiden terminalen Teilstücke über einen FKSG-Linker verknüpft (vgl. Kap. 3.2.1) und als Mini_eCyc_75 kloniert und gereinigt (vgl. Kap. 3.2.2.1 und 3.2.2.3).

3.2.2.1 Klonierung von pET11a/Mini_eCyc_75

Die Klonierung von Mini_eCyc_75 (vgl. Abb. 3.13) wurde mit Hilfe der direkten PCR-Mutagenese (vgl. Kap. 2.14.2) und einer nachfolgenden Ligation durchgeführt. Dafür wurden zwei Versuche parallel angesetzt. Als Template diente jeweils pET11a_eCycT1(1-272)-DNA (vgl. Tab. 2.3), deren Sequenz zwar in zwei Resten von der Mini_Cyc_45-Sequenz abweicht, die aber ebenfalls für ein aktives Cyclin T1 codiert.

Beide PCR-Ansätze unterschieden sich nur in den eingesetzten Primern: Ansatz 1 enthielt 5'eCycPep und T7-Terminator, Ansatz 2 enthielt 3'eCycPep und T7-Promotor (vgl. Tab. 2.4). Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelextraktion (vgl. Kap. 2.12.3) gewonnen und einer Restriktion (vgl. Kap. 2.13.1) mit *DraI* und *Bpu1102I* (Fragment aus Ansatz 1) bzw. mit *DraI* und *NdeI* (Fragment aus Ansatz 2) unterzogen.

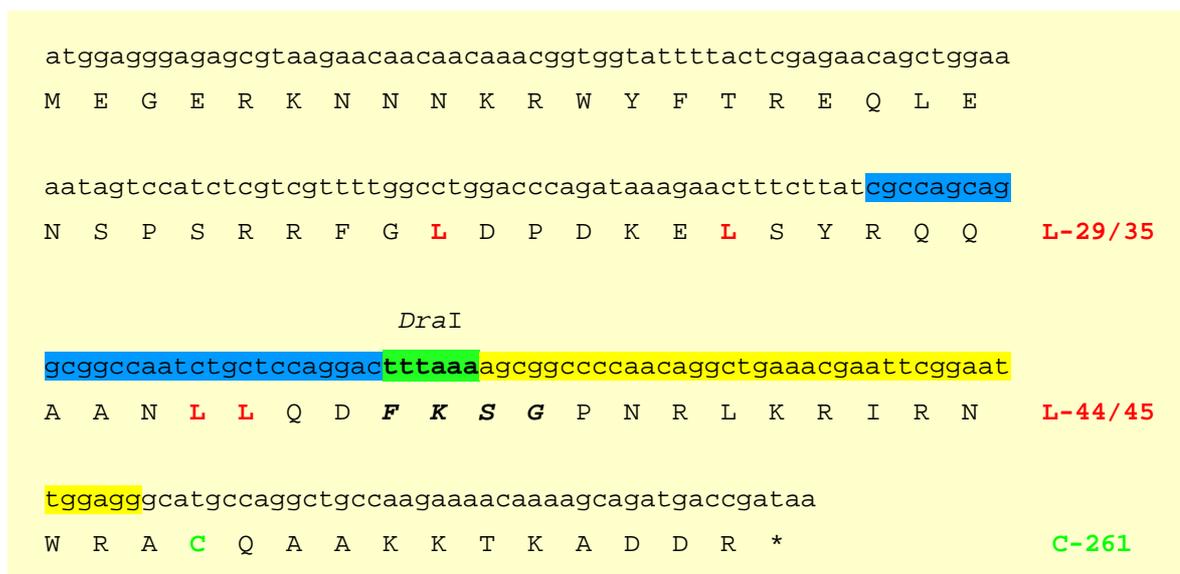


Abb. 3.13: Klonierung von Mini_eCyc_75

Die Klonierung von Mini_eCyc_75 wurde mit Hilfe einer PCR-Mutagenese durchgeführt (siehe Text). Basen sind in Kleinbuchstaben und Aminosäuren in Großbuchstaben dargestellt. Die durch die Einführung des FKSG-Linkers (fett-kursiv) entstehende *DraI*-Schnittstelle ist fett gedruckt. Das Cystein-261 (grün) und die Leucine-29, -35 -44, -45 (alle rot) des 272 Reste großen eCyclin T1, die wahrscheinlich an der Tat-Bindung beteiligt sind, sind farblich und fett markiert. Der Primer-Bereich ist für 5'eCycPep gelb, für 3'eCycPep blau und für den überlappenden Bereich grün unterlegt. Das Stopp-Codon ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Bei der nachfolgenden Ligation (vgl. Kap. 2.13.4) der beiden Fragmente wurden diese direkt mit einem *Nde*I- und *Bpu*1102I-verdauten pBluescript-Vektor (vgl. Tab. 2.3) ligiert. Nach der Ligation wurde eine Butanol-fällung (vgl. Kap. 2.12.1) durchgeführt.

Die so gewonnene pBluescript/Mini_eCyc_75-DNA wurde per Elektroporation (vgl. Kap. 2.15.2.2) in *E. coli* Top10 transferiert. Von den über Nacht gewachsenen Klonen wurden 14 ausgewählt und in einer Kolonie-PCR (vgl. Kap. 2.14.1) mit nachfolgender Agarosegelelektrophorese untersucht (vgl. Abb. 3.14). Da offensichtlich mehrere der DNA-Sequenz-Varianten von Mini_eCyc_75 entstanden waren, wurde die Plasmid-DNA aus vier ausgewählten Klonen präpariert (vgl. Kap. 2.11.2), mit *Dra*I verdaut (vgl. Kap. 2.13.1) und wiederum im Agarosegel überprüft. Bei der Restriktion des gewünschten Produkts entstehen Bruchstücke mit genau definierter Länge, die schließlich nur bei einem Klon gefunden werden konnten (vgl. Abb. 3.14 B). Die DNA-Sequenz desselben wurde in einer Sequenzierung (vgl. Kap. 2.13.4) überprüft und erwies sich mit der gewünschten als identisch.

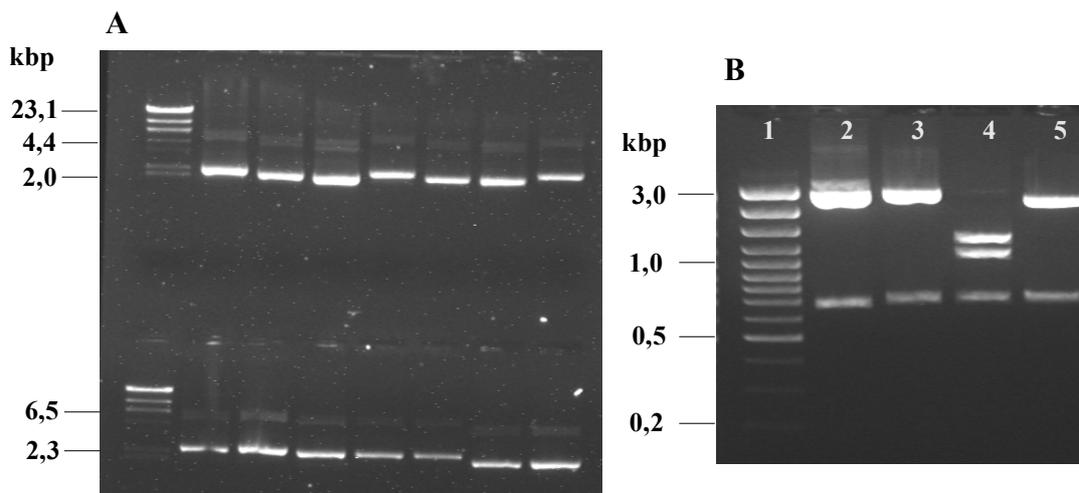


Abb. 3.14: PCR-Analyse und Restriktion der DNA von Mini_eCyc_75-Klonen

Die Abbildung zeigt 1,5 % Agarosegele. **A:** Gel nach Kolonie-PCR; obere Reihe von links nach rechts: Lambda/*Hind*III-Standard, Klone 1-7; untere Reihe von links nach rechts: Lambda/*Hind*III-Standard, Klone 8-14. Die PCR-Amplifikate haben unterschiedliche Größe, so dass die DNA zusätzlich durch einen *Dra*I-Verdau getestet wurde (siehe Text). **B:** Gel nach *Dra*I-Restriktion der DNA von vier ausgewählten Klonen (Nr. 1, 4, 5 und 13); Bahn 1: 100 bp-Standard; Bahnen 2-5: DNA von Klon 1, 4, 5 und 13. Die DNA von Klon 5 (Bahn 4) wurde mit *Dra*I charakteristisch verdaut, so dass Nr. 5 wahrscheinlich die richtige Sequenz beinhaltet, was durch eine Sequenzierung auch bestätigt werden konnte.

Die DNA aus diesem positiven Klon wurde dann mit *Nde*I und *Bpu*1102I verdaut, das Fragment per Gelextraktion gewonnen und mit einem - mit den gleichen Enzymen geschnittenen - pET11a-Vektor ligiert. Nach der Elektrotransformation der neuen pET11a/Mini_eCyc_75-DNA in *E. coli* Top10 wurde sie in *E. coli* BL21(DE3) transferiert. Einige der *E. coli* BL21(DE3)-pET11a/Mini_eCyc_75-Klone wurden in Induktionsversuchen auf die Expression von Mini_eCyc_75 untersucht (vgl. Kap. 3.2.2.2).

3.2.2.2 Expression von Mini_eCyc_75

Der Klon, der in den Induktionsversuchen die höchste Expressionsrate zeigte, wurde zur Produktion von Mini_eCyc_75 kultiviert. Die Kultur wurde bei 37 °C über 4 h in LB-Medium mit einer IPTG-Konzentration von 1 mM geschüttelt. Das SDS-Gel mit den zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben zeigt, dass bereits 1,5 h nach Induktionsbeginn vermehrt Mini_eCyc_75 produziert wurde (vgl. Abb. 3.15). Da die Zellen nach ca. 4 h ihr Wachstum einstellten, wurden sie zu diesem Zeitpunkt geerntet (vgl. Kap. 2.16.4) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

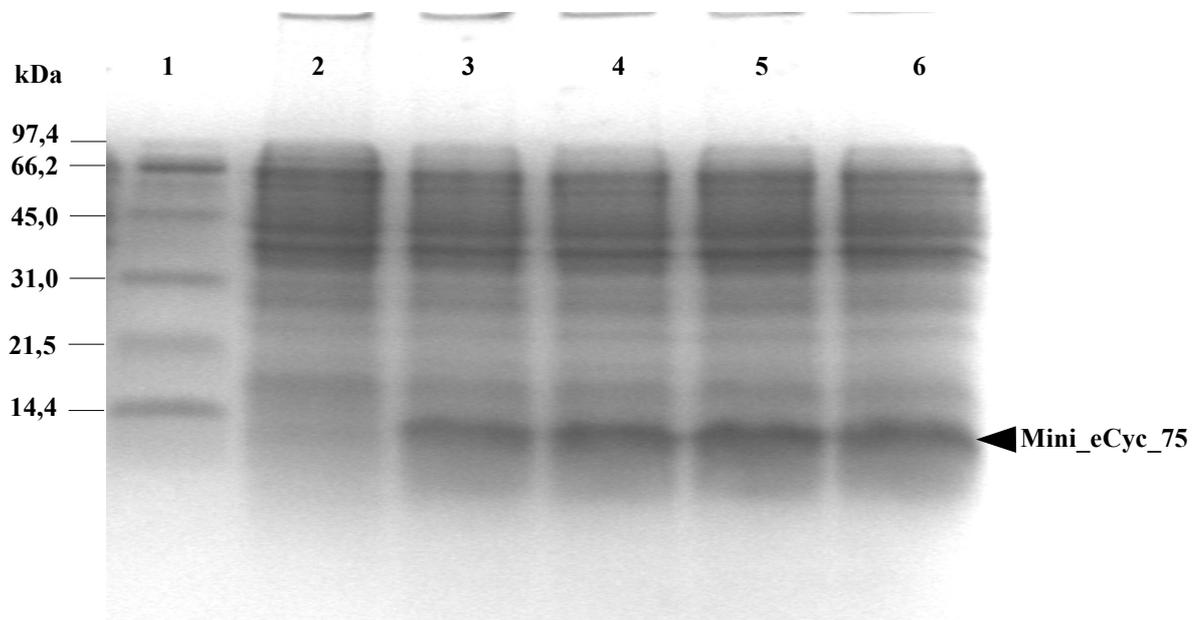


Abb. 3.15: Expression von Mini_eCyc_75 in *E. coli* BL21(DE3)

Bereits 1,5 h nach Beginn der Induktion mit 1 mM IPTG produzieren die Zellen vermehrt Mini_eCyc_75 (Größe: 9 kDa). Bahn 1: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard; Bahnen 2-6: Zellrohextrakt vor Induktion sowie 1,5, 2,5, 3,5 und 4 Stunden nach Induktion.

3.2.2.3 Reinigung von Mini_eCyc_75 über Heparin-Sepharose

Die Zellen wurden entweder frisch oder nach dem Auftauen in Aufschlusspuffer lysiert (vgl. Kap. 2.17.1). Die Reinigung wurde – wie in Kapitel 2.17.4 angegeben – durchgeführt.

Das Elutionsprofil zeigt zwei Peaks bei ca. 18 und 25 % Elutionspuffer (vgl. Abb. 3.16). Die jeweiligen Fraktionen wurden in einem SDS-Gel analysiert (vgl. Abb. 3.16). Solche mit Mini_eCyc_75 wurden gepoolt und dreimal gegen NMR-Puffer (50 mM K-Phosphat, 4 mM Na-Dithionit, pH 6,4) dialysiert (Ausschlussgrenze: 1 kDa).

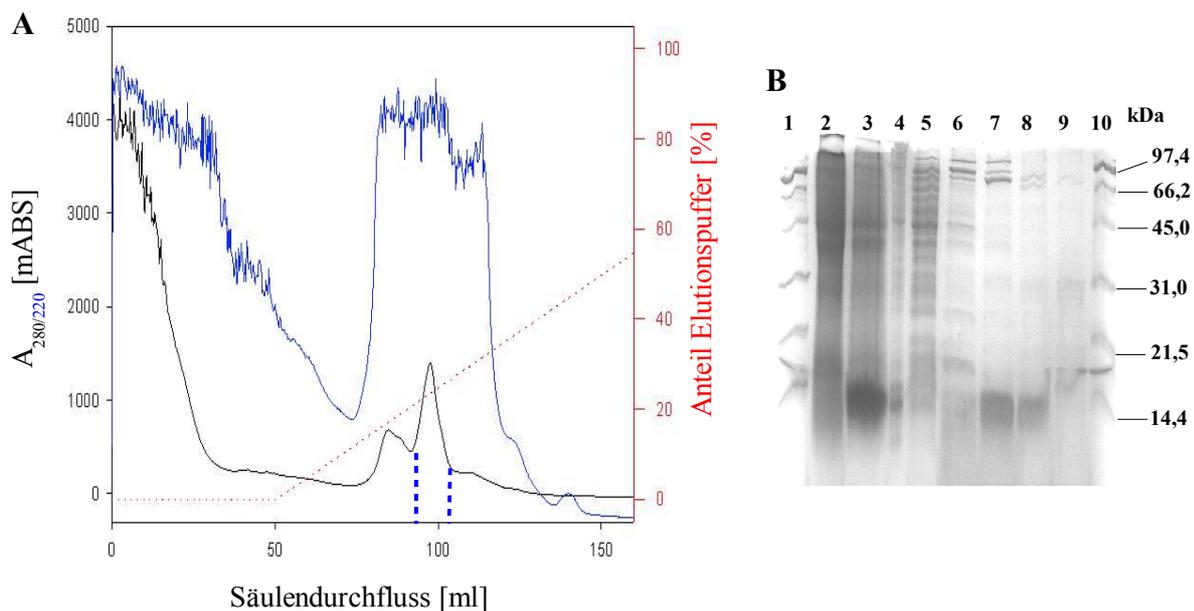


Abb. 3.16: Reinigung von Mini_eCyc_75 über Heparin-Sepharose

Mini_eCyc_75 wird von *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert und befindet sich nach dem Aufschluss im löslichen Überstand. Es bindet sehr gut an Heparin-Sepharose, eluiert bei ca. 700 mM NaCl und kann in für die NMR ausreichender Reinheit gewonnen werden. **A**: Elutionsprofil bei der Reinigung über eine Heparin-Sepharose. Der blau gestrichelte Bereich entspricht den Fraktionen, in denen Mini_eCyc_75 nachgewiesen werden konnte. **B**: SDS-Gel zur Analyse einzelner Fraktionen; Bahnen 1 und 10: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard; Bahnen 2 und 3: Expression vor Zugabe und 4 h nach Zugabe von 1 mM IPTG; Bahn 4: Überstand nach Aufschluss und Zentrifugation; Bahn 5: Durchlauf beim Auftrag auf die Säule; Bahnen 6-9: Fraktionen zwischen 20 und 25 % Anteil Elutionspuffer aus der Reinigung über Heparin-Sepharose (vgl. Teilabbildung A).

Nach der Dialyse wurde die Proteinkonzentration durch Zentrifugation mit einer Centrikon-Kammer (Ausschlussgrenze: 3 kDa) erhöht. Die Konzentration wurde dabei durch regelmäßige Entnahme von 20 μ l und deren Analyse in einem SDS-Gel überprüft (vgl. Abb. 3.17). So konnte gezeigt werden, dass sich Mini_eCyc_75 – ohne auszufallen – bis zu 300 μ M konzentrieren ließ.

Damit stand zum ersten Mal eine rekombinante Cyclin T1-Variante zur Verfügung, die hochkonzentriert werden konnte und sich stabil in einem für die NMR-Messungen geeigneten Puffer lösen ließ.

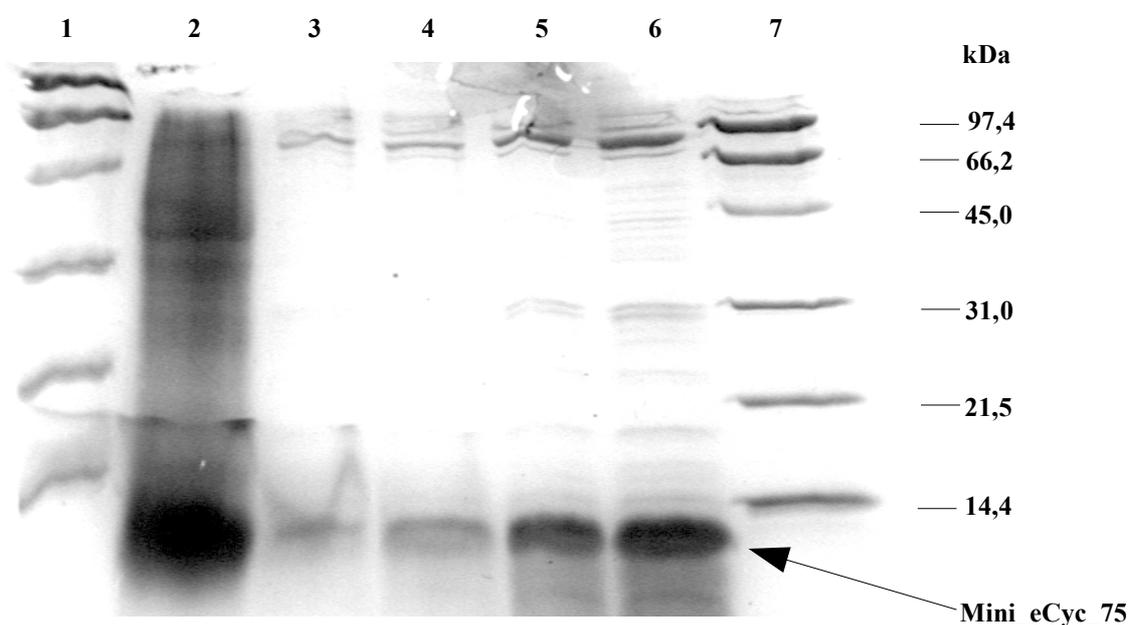


Abb. 3.17: Konzentration von Mini_eCyc_75

Durch Zentrifugation in einer 3 kDa-Centrikon-Kammer wurde die Proteinlösung bis auf 300 μ M konzentriert. Das 19 % SDS-Gel zeigt, dass Mini_eCyc_75 auch bei hohen Konzentrationen in Lösung bleibt und somit für eine strukturelle Analyse mit NMR geeignet ist. Bahnen 1 und 7: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard; Bahn 2: Zellrohextrakt nach 3,5 h Induktion mit 1 mM IPTG; Bahn 3: Proteinlösung nach Dialyse; Bahnen 4-6: Lösung nach Verdopplung, Vervierfachung und Verachtfachung der Konzentration.

Dieses verkürzte Cyclin sollte im Folgenden sowohl strukturell charakterisiert als auch als Bindungspartner für EIAV-Tat und TAR-RNA eingesetzt werden. Prinzipiell könnte auch die Ermittlung einer 3D-Struktur dieser Cyclin-Variante möglich sein, wofür jedoch eine höhere Konzentration oder eine Markierung mit Isotopen notwendig gewesen wäre. In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt aber auf der Untersuchung von Wechselwirkungen der einzelnen Bindungspartner, so dass keine Struktur berechnet wurde.

3.2.2.4 Strukturelle Charakterisierung von Mini_eCyc_75

Wie bereits für Mini-eCyc_45 sollten auch im Falle von Mini_eCyc_75 CD- und NMR-spektroskopische Untersuchungen erste Hinweise auf die Sekundärstrukturelemente dieses konstruierten Cyclins geben können.

Es wurde eine Probe Mini_eCyc_75 in NMR-Puffer (vgl. Kap. 3.2.2.3) mit einer Konzentration von 300 μM bei 20 $^{\circ}\text{C}$ in einer Plättchenküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 mm im CD-Spektrometer vermessen (vgl. Abb. 3.18). Das Spektrum deutet darauf hin, dass Mini_eCyc_75 unter den gegebenen Umständen unstrukturiert vorliegt.

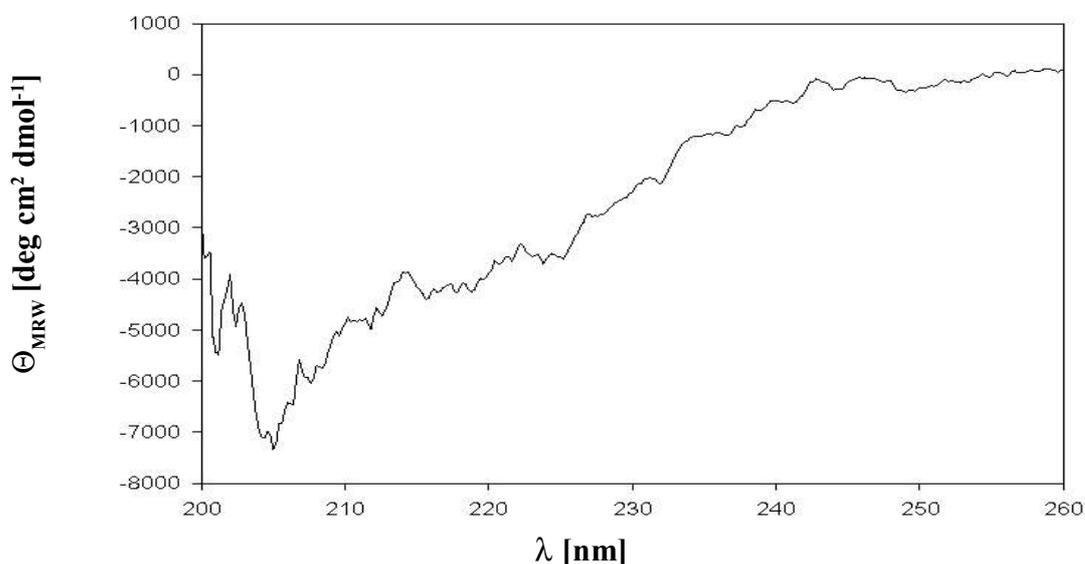


Abb. 3.18: CD-Spektrum von Mini_eCyc_75 bei pH 6,4

Das gereinigte Protein wurde in NMR-Puffer mit einer Konzentration von 300 μM in einer Plättchenküvette (Schichtdicke: 1 mm) bei 20 $^{\circ}\text{C}$ gemessen. Es wurden 8 Spektren akkumuliert.

Die gleiche Probe wurde auch für die Aufnahme eines 1D- ^1H -NMR-Spektrums (vgl. Abb. 3.19 A) verwendet. Es zeigt, dass das Protein offensichtlich unter den hier gemessenen Bedingungen wenig strukturiert vorliegt. Es finden sich nur wenige Resonanzen, die unter 1 ppm liegen. Sehr gut zu erkennen sind dagegen die Signale der Indolring-NH-Protonen der beiden Tryptophane bei ca. 10,2 ppm. Beim Vergleich mit dem 1D- ^1H -Spektrum von Mini_eCyc_45 werden einige Ähnlichkeiten deutlich (vgl. Abb. 3.19 B). So zeigt Mini_eCyc_75 genauso wie das 30 Reste kleinere Peptid eine geringe Dispersion im Amidprotonen-Bereich. Auch hochfeld verschobene Signale ($< 0,5$ ppm) sind keine zu beobachten. Das scharfe Signal bei ca. 0,2 ppm ist eher einer geringen Verunreinigung der Probe zuzuordnen.

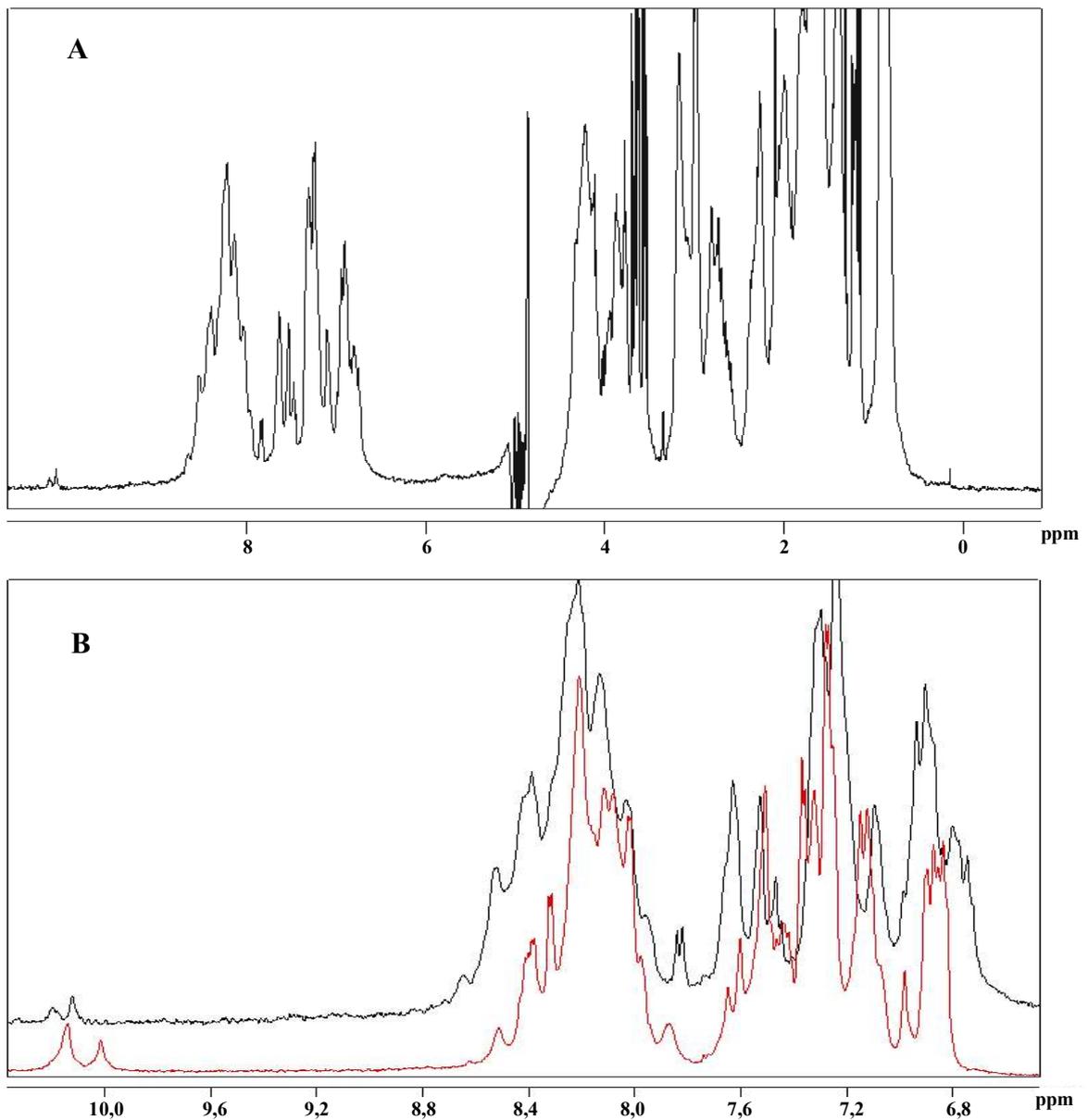


Abb. 3.19: 1D-¹H-NMR-Spektrum von Mini_eCyc_75 bei pH 6,4

Angegeben sind die chemischen Verschiebungen zwischen 0 und 11 ppm (A) bzw. eine Vergrößerung des Bereiches zwischen 6,5 und 10,3 ppm beim Vergleich zwischen Mini_eCyc_75 (schwarz) mit Mini_eCyc_45 (rot). Gemessen wurde bei einer Konzentration von 200 μ M Protein bzw. 1,8 mM Peptid in K-Phosphat-Puffer (50 mM, 4mM Na-Dithionit, pH 6,4) bei 293 K bzw. 298 K. Trotz einer leichten Verschiebung aufgrund der unterschiedlichen Temperaturen sind die Ähnlichkeiten deutlich zu erkennen.

3.3 Reinigung von isotopenmarkiertem EIAV-Tat

Die Reinigung von einfach (^{15}N) oder doppelt (^{13}C und ^{15}N) markiertem EIAV-Tat erfolgte nach den Vorgaben von Rosin-Arbesfeld et al. (1994) aus *E. coli* BL21(DE3)/pETATA2E (vgl. Tab. 2.3). Die Zellkultivierung wurde in M9-Medium bei 37 °C (vgl. Kap. 2.4.3) mit ^{15}N - NH_4Cl bzw. mit ^{13}C -Glukose und ^{15}N - NH_4Cl durchgeführt. Induziert wurde 3-4 h mit 1 mM IPTG.

Das Protein wurde über eine Chelating-Sepharose gereinigt (vgl. Kap. 2.17.2), wobei reines His-EIAV-Tat erhalten wurde (vgl. Abb. 3.20). Nach einer Bromcyan-Spaltung (vgl. Kap. 2.17.6) wurden schließlich über eine zweite Säule EIAV-Tat und His-EIAV-Tat getrennt.

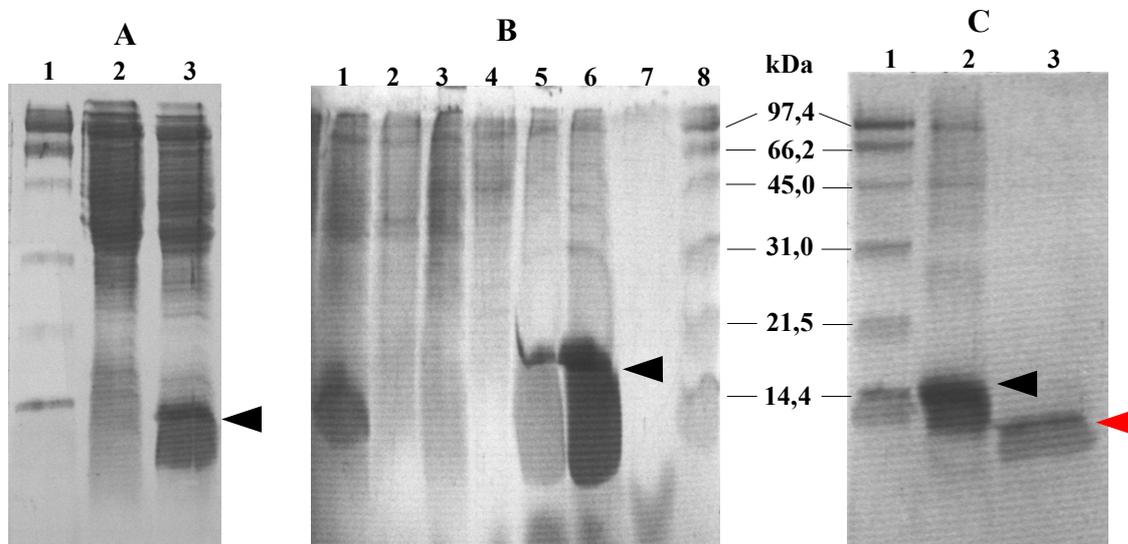


Abb. 3.20: Expression und Reinigung von ^{15}N -markiertem EIAV-Tat

Die Reinigung erfolgte an einer Chelating-Sepharose bei pH 8,0 (s. Text). Die Abbildungen zeigen 19 % SDS-Gele. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit TCA gefällt (vgl. Kap. 2.17.8). **A:** Expression von His-EIAV-Tat (Pfeil). Bahn 1: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard; Bahn 2: Zellrohextrakt vor Induktion; Bahn 3: Zellrohextrakt 3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG. **B:** Reinigung von His-EIAV-Tat (Pfeil) über Chelating-Sepharose. Bahn 1: löslicher Überstand nach denaturierendem Aufschluss und Zentrifugation; Bahnen 2-4: Probendurchlauf, Waschen mit Bindungspuffer und mit Waschpuffer; Bahnen 5-7: Elutionsfraktionen; Bahn 8: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard. **C:** Nach der Bromcyan-Spaltung lassen sich gespaltenes (roter Pfeil) und ungespaltenes Protein (schwarzer Pfeil) über eine zweite Säule trennen. Bahn 1: Bio-Rad-Molekulargewichtstandard; Bahn 2: His-EIAV-Tat vor Spaltung; Bahn 3: reines EIAV-Tat nach Bromcyan-Spaltung und zweiter Chelating-Sepharose. Die Reinigung von doppelt markiertem EIAV-Tat wurde identisch durchgeführt.

Das gespaltene Protein wurde im lyophilisierten Zustand bei 4 °C aufbewahrt, und konnte nach dem Lösen im jeweiligen NMR-Puffer direkt für strukturelle Untersuchungen eingesetzt werden. Das ungespaltene Protein wurde erneut einer Bromcyan-Spaltung unterzogen, falls weiteres gespaltenes EIAV-Tat benötigt wurde.

3.4 Rückgrat-Zuordnung von ^{13}C - ^{15}N -EIAV-Tat im ^{15}N -HSQC

Da für eine Strukturberechnung von EIAV-Tat im Komplex mit Cyclin T basierend auf NMR-Daten hohe Proteinkonzentrationen ($> 1 \text{ mM}$) erforderlich sind, diese bisher aber nur in ungebundenem Zustand in Lösung erreicht werden konnten, sollte statt dessen die Analyse von HSQC-Spektren Hinweise über eine Komplexbildung und die daran beteiligten Aminosäuren geben. Dabei würde eine Bindung an unterschiedliche Komplexpartner durch eine Veränderung einzelner chemischer Verschiebungen sichtbar. Außerdem ist die Aufnahme von HSQC-Spektren bis zu einer Konzentrationen von ca. $100 \mu\text{M}$ möglich.

So mussten zunächst die Resonanzen im HSQC-Spektrum von EIAV-Tat den dazugehörigen Aminosäuren zugeordnet werden.

Die Aufnahme von TOCSY-HSQC- und NOESY-HSQC-Spektren (vgl. Tab. 2.5) von ^{15}N -markiertem EIAV-Tat und deren Auswertung führte leider nur zur Bestimmung von 22 Aminosäuren (vgl. Abb. 3.21). Die meisten Resonanzen konnten wegen unvollständiger Spinsysteme nicht zugeordnet werden. Um aber möglichst alle Resonanzen zuordnen zu können, wurden mit doppelt markiertem EIAV-Tat Tripleresonanz-Experimente durchgeführt (vgl. Tab. 2.5). Deren Auswertung führte schließlich zur nahezu vollständigen Zuordnung der Resonanzen von ^{13}C - ^{15}N -EIAV-Tat (vgl. Kap. 9.2).

Zunächst wurden für jedes Signal des ^{15}N -HSQC-Spektrums die Tripleresonanz-Spektren in der jeweiligen N-Ebene verglichen. Aus diesen Spektren lassen sich unter anderem die $^{13}\text{C}\alpha/^{13}\text{C}\beta$ -Verschiebungen der einer Aminosäure (i) ermitteln. Ebenso können alle aliphatischen ^{13}C -Verschiebungen des aminoterminalen Nachbarn (i-1) bestimmt werden (vgl. Abb. 3.22). Damit ist eine eindeutige Bestimmung des Aminosäurentyps für i-1 möglich. Die $^{13}\text{C}\alpha(i)/^{13}\text{C}\beta(i)$ -Verschiebungen erlauben wiederum Rückschlüsse auf die Aminosäure i. Da sich die einzelnen Signale von gleichartigen Resten in ihren chemischen Verschiebungen leicht unterscheiden, war auch die Zuordnung von Aminosäurenpaaren, die mehr als einmal in der Tat-Sequenz aufeinander folgen, möglich. Protonen-Resonanzen, deren Kohlenstoffe ähnliche Verschiebungswerte aufweisen, konnten in einem ^{13}C -ctHSQC-Spektrum unterschieden werden (vgl. Abb. 3.23).

Die Zuordnung über die Informationen der Aminosäure i-1 war leicht möglich, da die chemischen Verschiebungen weitgehend unstrukturierter Proteine – wie EIAV-Tat – nahe der coil-Werte sind und somit aus Tabellen entnommen werden konnten.

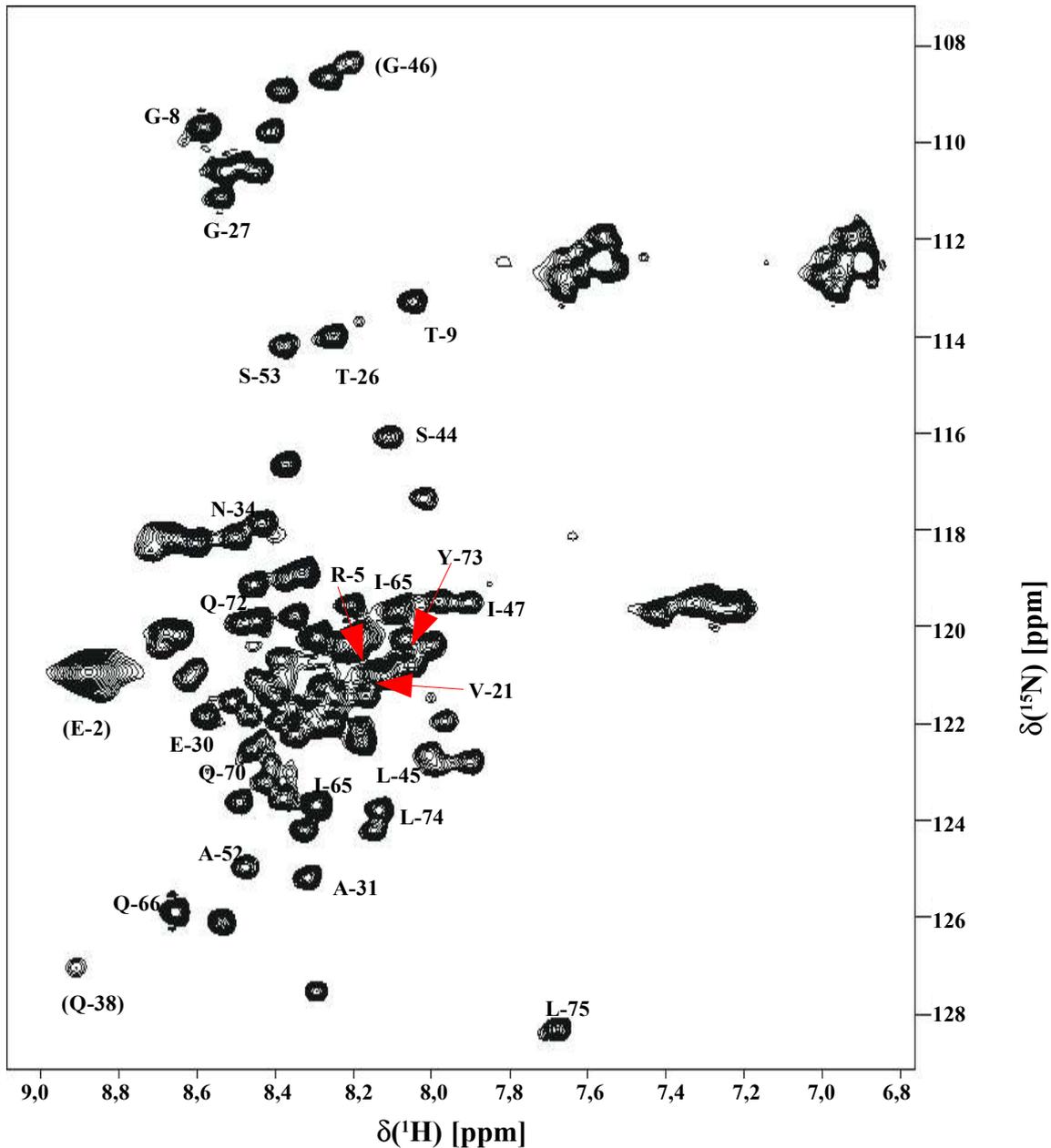


Abb. 3.21: Zuordnung einzelner Aminosäuren von ^{15}N -EIAV-Tat im ^{15}N - ^1H -HSQC

Es wurde eine Probe von ^{15}N -markiertem EIAV-Tat bei einer Konzentration von 500 μM in 50 mM K-Phosphat bei pH 6,4 und 293 K gemessen. Die Zuordnung erfolgte durch die Auswertung von TOCSY- und NOESY-HSQC-Spektren (vgl. Haupttext). Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code und mit ihrer Sequenznummer angegeben. Aminosäuren in Klammern konnten durch den Vergleich mit Daten von unmarkiertem EIAV-Tat (Willbold, 1993) aufgrund ihrer exponierten Stellung im Spektrum zugeordnet werden.

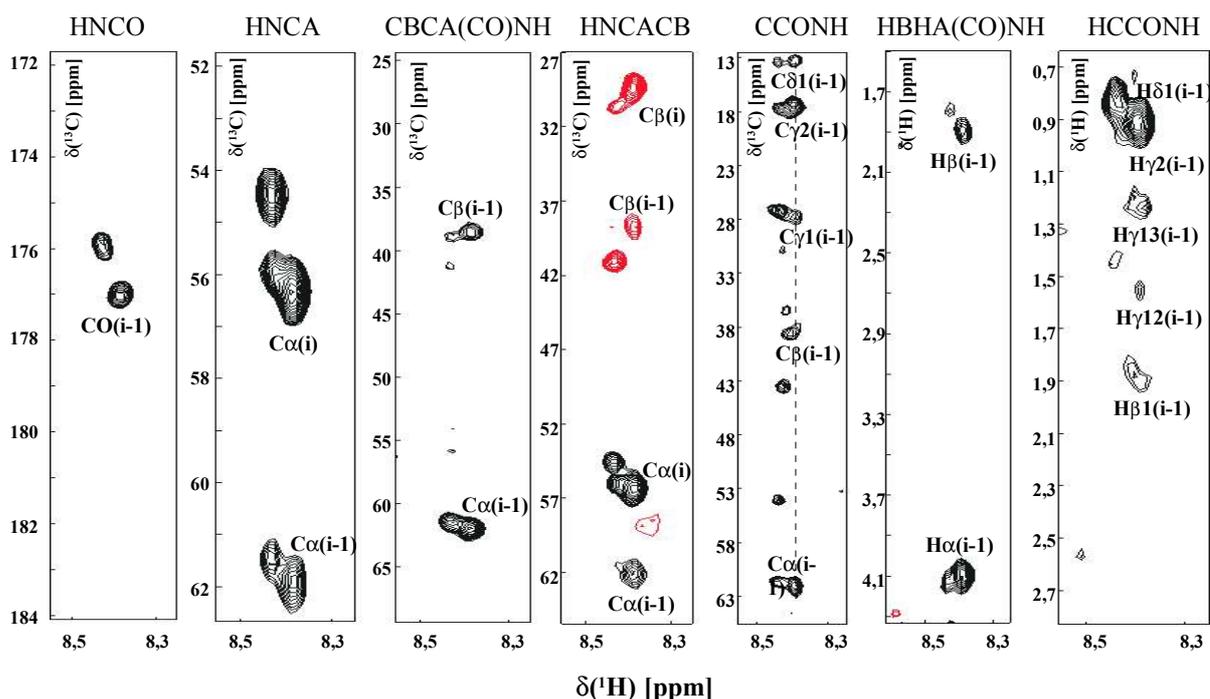


Abb. 3.22: Sequenzspezifische Zuordnung von EIAV-Tat am Beispiel von I-65/Q-66

Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoff- und Wasserstoffatome konnten durch die Auswertung der Tripleresonanz-Experimente bestimmt werden. Alle Spektren werden dabei in der ^{15}N -Ebene betrachtet, in der sich die NH-Verschiebung von der zu bestimmenden Aminosäure (i) befindet. Diese wird aus dem ^{15}N - ^1H -HSQC ausgelesen. Die typischen Resonanzen von $\text{C}\alpha(\text{i}-1)$ mit ca. 62 ppm bzw. $\text{C}\beta(\text{i}-1)$ mit ca. 38 ppm, die im HNCACB und CBCA(CO)NH beobachtet werden können, sowie von den Kohlenstoff- bzw. Protonen-Leitern im CCONH bzw. HCCONH weisen die Vorgänger-Aminosäure eindeutig als Isoleucin aus. Aus der Sequenz von EIAV-Tat lässt sich schließen, dass die zu bestimmende Resonanz im ^{15}N - ^1H -HSQC entweder zum Asparagin-48 oder zum Glutamin-66 gehören muss, da beide ein Isoleucin als Vorgänger besitzen, genauso wie das Prolin-8, das allerdings keinen NH-Verschiebungswert besitzt. Aufgrund der Werte von $\text{C}\alpha(\text{i})$ mit ca. 56 ppm und $\text{C}\beta(\text{i})$ mit ca. 28 ppm, die im HNCACB beobachtet werden, kann die Aminosäure (i) kein Asparagin sein, da die Resonanzen sonst bei ca. 53 ppm und 39 ppm zu finden wären. Somit ist die Aminosäure i das Glutamin-66 und der Vorgänger demnach Isoleucin-65. Alle sonstigen chemischen Verschiebungen lassen sich aus dem HNCO und HBHA(CO)NH ermitteln.

Für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen von EIAV-Tat wurde auch ein ^{13}C -ctHSQC (constant time HSQC) aufgenommen, das die Signale aller an ein Kohlenstoff gebundenen Protonen zeigt (vgl. Abb. 3.23). Es illustriert, dass die ^{13}C -Verschiebungen sehr aminosäurentypisch sind.

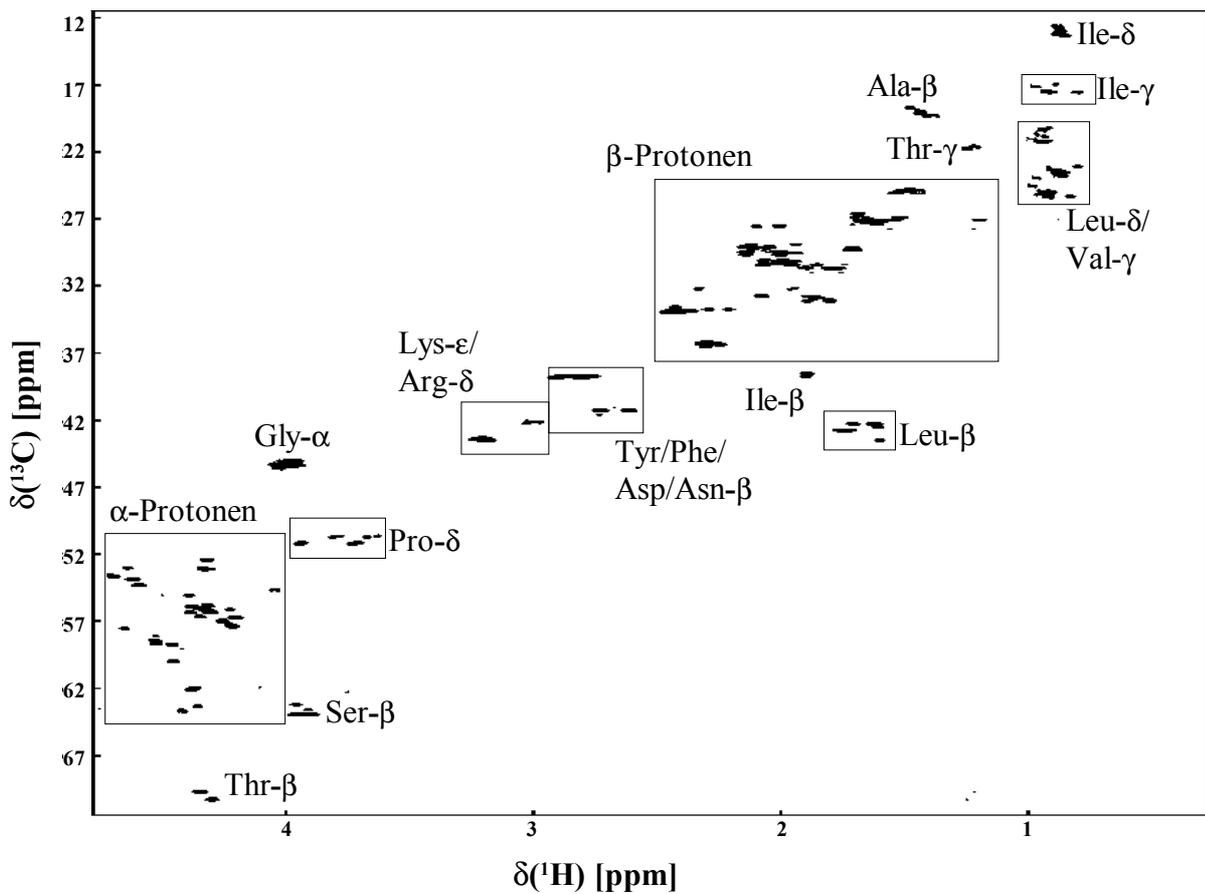


Abb. 3.23: ^{13}C -ctHSQC von doppelt markiertem EIAV-Tat

Das Spektrum zeigt die Korrelationen der Kohlenstoffe mit den direkt daran gebundenen Protonen. Gekennzeichnet sind die verschiedenen Gruppen der $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Korrelationen.

Durch die nahezu vollständige sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen mit Hilfe der Tripleresonanz-Experimente war es möglich, anhand der Signale im ^{15}N -HSQC (vgl. Abb. 3.24) die Komplexbildungs-Vorgänge mit potentiellen Bindungspartnern fortan auf atomarer Ebene bzw. auf Ebene der einzelnen Aminosäuren beobachten zu können.

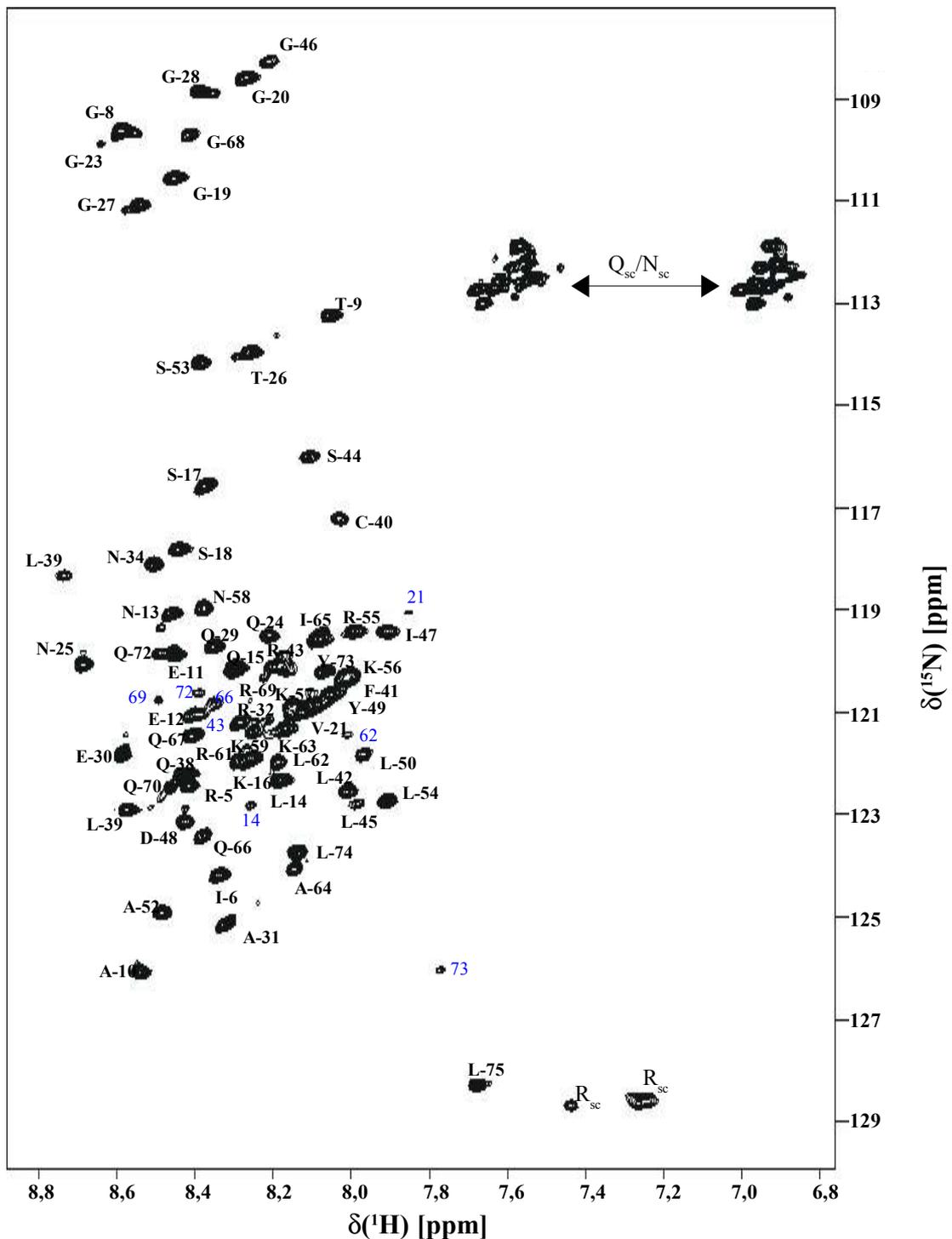


Abb. 3.24: Sequenzspezifische Zuordnung von ^{13}C - ^{15}N -EIAV-Tat im ^{15}N - ^1H -HSQC

Es wurde eine Probe von ^{13}C - und ^{15}N -markiertem EIAV-Tat bei einer Konzentration von $400\ \mu\text{M}$ in $50\ \text{mM}$ K-Phosphat bei $\text{pH}\ 6,4$ und $293\ \text{K}$ gemessen. Die Zuordnung erfolgte durch die Auswertung aller 3D-NMR-Spektren und wurde verifiziert durch vorherige Zuordnungen an ^{15}N -markiertem bzw. unmarkiertem EIAV-Tat (vgl. Abb. 3.21 bzw. Willbold et al., 1993). Blaue Zahlen zeigen mehrere Resonanzen für eine Aminosäure an, was auf konformationelle Heterogenität zurückzuführen sein könnte; sc (side chain) steht für Seitenketten-Signale.

Da die Spektren von EIAV-Tat im Komplex teilweise unter reduzierenden Bedingungen aufgenommen werden sollten, sollten in einem ersten Schritt die Effekte einer Reduktion auf die Proteinstruktur geklärt werden (vgl. Abb. 3.25).

Dabei konnten nach der Zugabe von Na-Dithionit zwar keine Veränderungen beobachtet werden, einige Resonanzen verschwanden jedoch vollständig. Dabei handelt es sich um Aminosäuren, die zur Core-Region gehören oder am Rande des argininreichen Motivs (ARM) liegen: Glutamin-38, Leucin-39, Cystein-40, Leucin-42, Serin-44 bis Leucin-50, Alanin-52, Serin-53, Leucin-54 und Alanin-64.

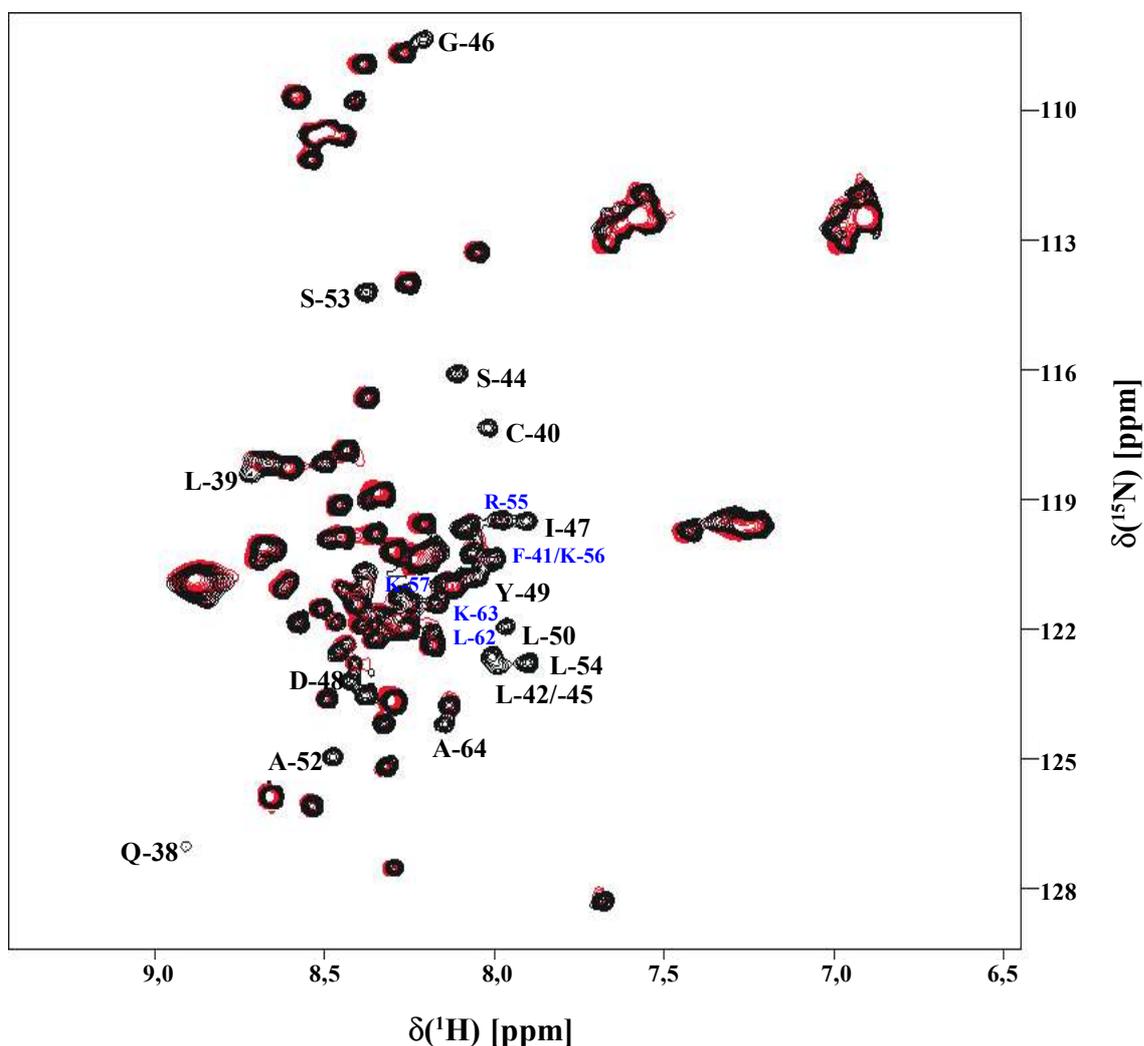


Abb. 3.25: Vergleich der HSQC-Spektren von oxidiertem und reduziertem ^{15}N -EIAV-Tat.

Nach der Zugabe von Na-Dithionit (rotes Spektrum) verschwinden die Signale von Glutamin-38 bis Cystein-40, Leucin-42, Serin-44 bis Leucin-50, Alanin-52 bis Leucin-54 und Alanin-64. Phenylalanin-41, Arginin-55 bis Lysin-57, Leucin-62 und Lysin-63 sind nur noch schwach zu erkennen (blau).

Die Signale von Phenylalanin-41, Arginin-55 bis Lysin-57, Leucin-62 und Lysin-63 verschwanden zwar nicht vollständig, wiesen aber eine geringere Intensität auf. D. h., auch die Aminosäuren des arginireichen Motivs sind von einer Reduktion betroffen.

3.5 Wechselwirkungen von EIAV-Tat mit TAR, Cyclin und TF53

Alle bisher vorgenommenen Untersuchungen an Cyclinen, Tat-Proteinen und TAR-RNA in verschiedenen Komplexen wurden bei geringen Konzentrationen durchgeführt, die jedoch zur Zeit nicht ausreichen, um 3D-Strukturen mit der NMR zu ermitteln.

Der Versuch, beispielsweise den Komplex von EIAV-Tat und TAR-RNA mit NMR zu untersuchen, scheiterte immer daran, dass die Bindungspartner einzeln oder gemeinsam präzipitierten (Willbold, 1993). Ternäre Komplexe aus Tat, TAR und Cyclin T1 sind möglicherweise stabiler (Zhang et al., 2000), da vor allem das Cyclin T1 über hydrophobe Bereiche verfügt (vgl. Kap. 3.1.1.3), die bei einer Komplexbildung möglicherweise abgedeckt sein könnten. Zunächst wurden binäre Komplexe als Vorstufe der ternären untersucht.

3.5.1 Binäre Interaktionen

Da EIAV-Tat unter etablierten Bedingungen sowohl einfach als auch doppelt markiert im Labor herstellbar ist, wurden binäre Komplexe von Tat mit TAR-RNA, verschiedenen Cyclin T1-Varianten und mit dem Inhibitor TF53 untersucht.

3.5.1.1 Wechselwirkungen zwischen EIAV-Tat und TAR-RNA

Die hier verwendete TAR-RNA wurde mittels *in vitro*-Transkription (vgl. Kap. 2.6) hergestellt und im lyophilisierten Zustand bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Sie war gegenüber der bisher verwendeten RNA um 6 Nukleotide verlängert worden, so dass drei weitere Basenpaarungen entstanden (vgl. Abb. 3.26 A). Dadurch konnte die Transkriptionsrate gesteigert werden. Außerdem ist die RNA in dieser längeren Form stabiler.

Direkt vor der Messung wurde die RNA in 10 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6,4 mit einer Konzentration von 150-180 µM gelöst, 3 min bei 90 °C inkubiert und schließlich auf Eis gelagert. Die so erhaltene Faltung wurde durch ein 1D-¹H-NMR-Experiment verifiziert (vgl. Abb. 3.26 B).

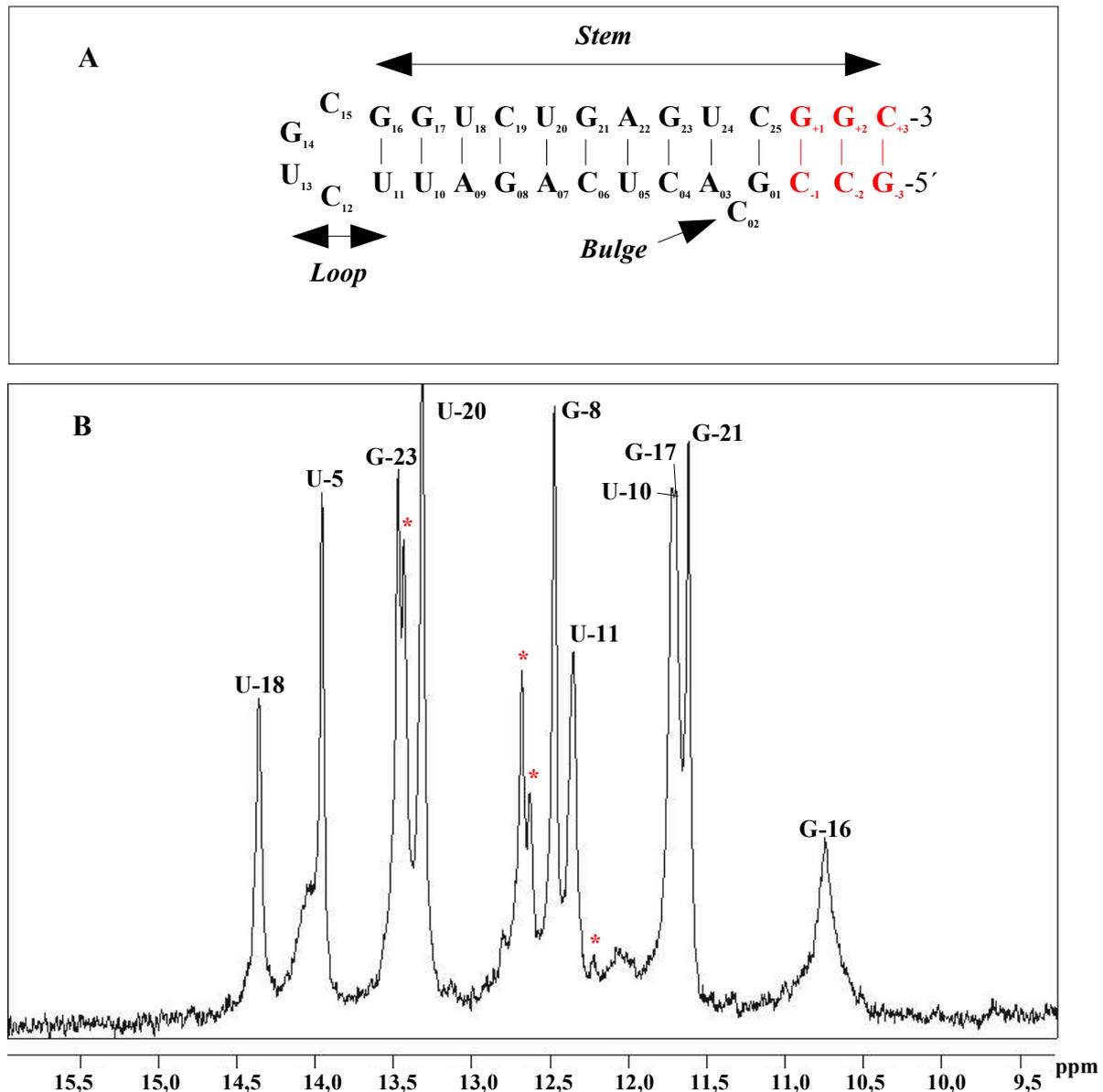


Abb. 3.26: Struktur und 1D-¹H-Spektrum von EIAV-TAR-RNA

Gefaltete TAR-RNA zeigt im Bereich von 10,5 bis 14,5 ppm ein typisches Muster an Resonanzen (**B**), die den chemischen Verschiebungen der Imino-Protonen entsprechen, die aufgrund der Basenpaarungen im Stamm-Bereich der RNA (**A**) sichtbar werden. Die Beschriftung der Peaks mit den zugehörigen Basen erfolgte nach Literaturwerten (Hoffmann & White, 1995). Einige Peaks (mit * gekennzeichnet), die durch die Verlängerung der TAR-RNA zustande kommen (rot, s. Text), verblieben ohne Zuordnung, da keine weiteren strukturellen Daten durch zusätzliche Spektren von markierter RNA vorlagen.

Nach der Überprüfung der Faltung wurde die TAR-RNA in einem Centrikon-Gefäß (Ausschlussgrenze: 3 kDa) konzentriert (vgl. Kap. 2.17.10).

Um die Bindung von EIAV-Tat an TAR zu untersuchen, wurden sowohl 1D- als auch 2D-

HSQC-Experimente ausgewertet. Dafür wurden jeweils 250 μl der zu 200-250 μM in NMR-Puffer gelösten Bindungspartner zu einem Gesamtvolumen von 500 μl gemischt, so dass beide Partner in einer Konzentration von ca. 100 μM vorlagen. Dabei konnte keine Präzipitation beobachtet werden. Es wurden 1D- ^1H - und ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren (vgl. Tab. 2.5, Kap. 2.19.2) aufgenommen. Der Vergleich der 1D-Spektren von TAR-RNA mit und ohne EIAV-Tat zeigt, dass nur geringfügige Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Imino-Protonen auftreten (vgl. Abb. 3.27). Besonders die nicht zugeordneten Resonanzen, deren Imino-Protonen sich am Fuß des RNA-Stammes befinden und damit möglicherweise instabilere Wasserstoffbrücken bilden, sind etwas verschoben, wahrscheinlich aufgrund von Wechselwirkungen mit EIAV-Tat in einem mehrere Basenpaare entfernten Bereich. Bei einer direkten Bindung am Stamm der RNA wären größere Verschiebungen zu erwarten gewesen.

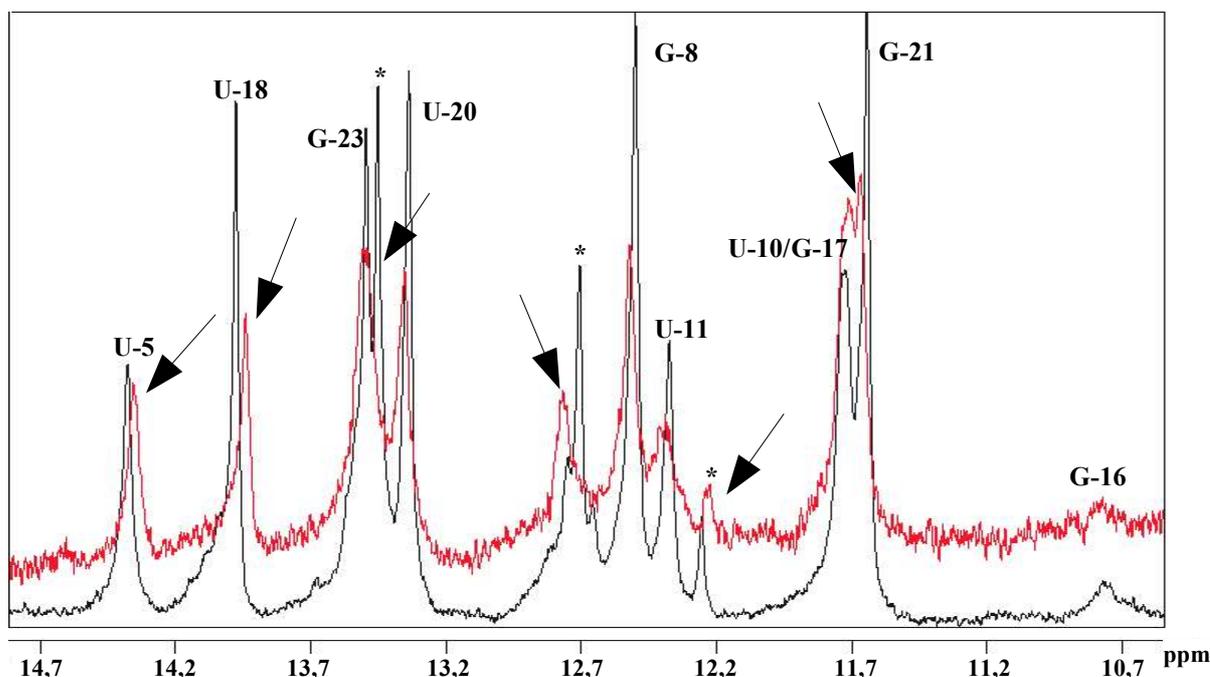


Abb. 3.27: Imino-Protonen-Bereich der 1D- ^1H -Spektren von TAR-RNA mit und ohne EIAV-Tat

Beim Vergleich der beiden Spektren (Schwarz: TAR-RNA, Rot: Tat/TAR-Komplex) wird deutlich, dass sich eine etwaige Bindung von EIAV-Tat an TAR-RNA kaum auf die Signale der Imino-Protonen auswirkt. Die größten Änderungen gibt es in den Werten der nicht zugeordneten Iminos, die sich am Fuß des RNA-Stammes befinden und möglicherweise besonders instabil sind. Aber auch die Signale von U-5, U-18, G-17 und G-21 sind etwas verschoben.

Aber auch die Signale von U-5, U-18, G-21 sowie vom Iminopaar U-10/G-17 sind leicht verschoben. Die Bindung von Tat, die ja wahrscheinlich im Loop-Bereich der RNA ansetzt (vgl. Kap. 1.3.1), hat also nur geringe Auswirkungen auf den Stamm der TAR-RNA, denn die Veränderungen einzelner Signale sind nur schwach ausgeprägt und liegen höchstens bei 0,05 ppm.

Ob die beobachteten Verschiebungen möglicherweise durch die Instabilität der RNA – z. B. wegen leichter pH-Schwankungen oder der Zugabe von Na-Dithionit als Reduktionsmittel – oder durch eine Bindung von EIAV-Tat hervorgerufen wurden, konnte anhand eines einfachen Experimentes überprüft werden.

Es wurde unter den oben genannten Bedingungen gefaltete RNA mit und ohne Na-Dithionit NMR-spektroskopisch untersucht. Über insgesamt 12 h wurden mehrere 1D-Experimente gemessen und miteinander verglichen (vgl. Abb. 3.28). Dabei zeigten sich keine Veränderungen in den chemischen Verschiebungen der Imino-Protonen; die Spektren waren absolut identisch. Also auch das Vorhandensein von Reduktionsmittel, das erst bei Zugabe von EIAV-Tat im Puffer enthalten war, äußert sich nicht in einer Veränderung der Imino-Protonen-Verschiebungen der TAR-RNA.

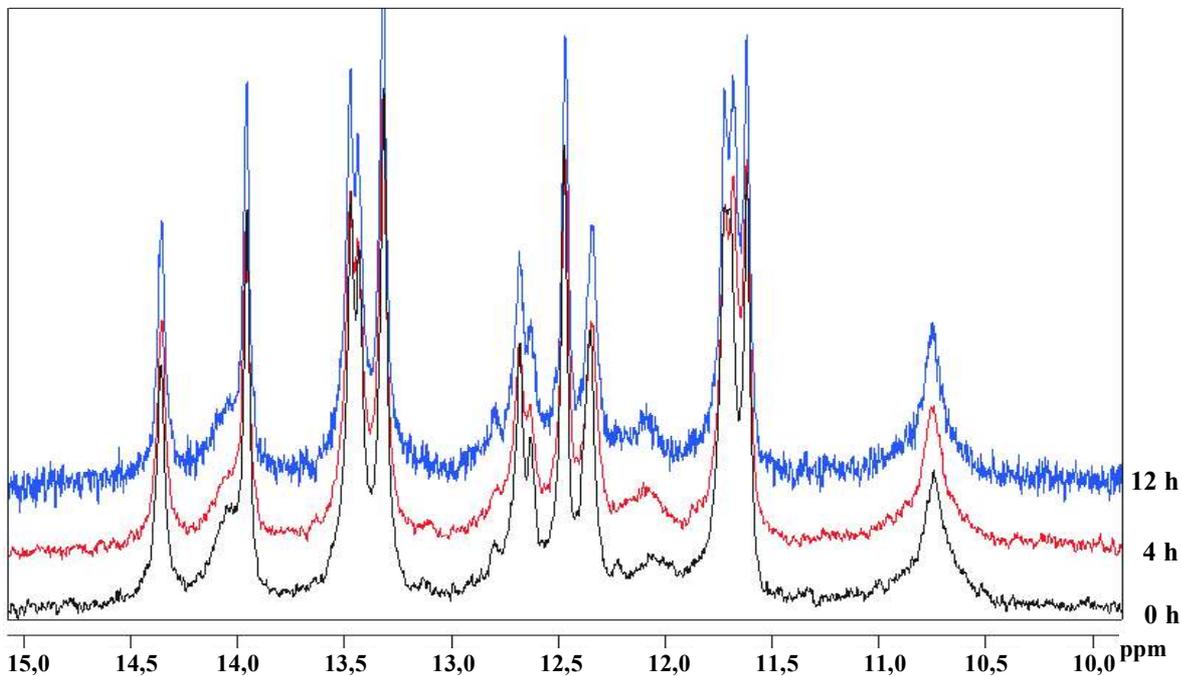


Abb. 3.28: Vergleich der 1D-Spektren von TAR-RNA zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Faltung der TAR-RNA bleibt auch nach über 12 h Messzeit und trotz Zugabe von 4 mM Na-Dithionit erhalten, so dass die jeweiligen 1D-Imino-Spektren absolut identisch sind. Trotz einer leichten Abnahme der Signalintensität sind weder Verschiebungen noch Linienverbreiterungen erkennbar. 0 h: TAR oxidiert; 4/12 h: TAR reduziert.

Um weitere Hinweise auf eine Komplexbildung zwischen Tat und TAR zu finden, wurde der Bereich zwischen 5 und 9 ppm des 1D-Spektrums analysiert (vgl. Abb. 3.29). In diesem Bereich können sowohl isolierte RNA-Signale (5,0-6,5 ppm) als auch überlagerte Signale von Tat und TAR (6,6-9,0 ppm) beobachtet werden. Auch hier waren einzelne Veränderungen der RNA-Signale zu finden. Zudem konnte trotz nahezu gleicher Intensitäten eine Verbreiterung der Signale festgestellt werden, was ein zusätzliches Zeichen auf eine Bindung an Tat ist.

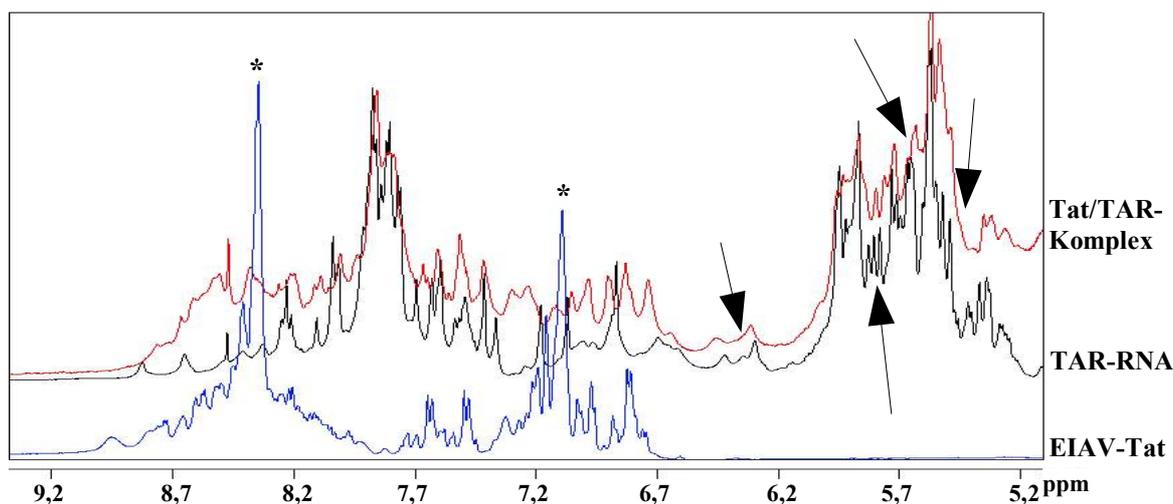


Abb. 3.29: 1D-¹H-Spektrum vom Tat/TAR-Komplex

Vor allem im Bereich zwischen 5,0 und 6,5 ppm lassen sich einzelne RNA-Signale beobachten, deren Linienbreite sich bei der Zugabe von EIAV-Tat verbreitert, bzw. die teilweise verschoben sind (Pfeile). Eine Zuordnung der einzelnen Signale war mit den Literaturdaten nicht möglich, da schon die Imino-Signale bis zu 0,05 ppm große Unterschiede aufwiesen, die im hier vorliegenden Bereich mit geringerer Dispersion zu viele Möglichkeiten der Zuordnung ergeben hätten. Bei den mit * gekennzeichneten Peaks handelt es sich möglicherweise um Verunreinigungen.

Die Auswirkungen einer Komplexbildung auf EIAV-Tat wurden anhand eines ¹⁵N-¹H-HSQC-Spektrums von ¹⁵N-markiertem Protein untersucht. Dabei konnten mehrere Veränderungen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.30). Durch die bereits geleistete Zuordnung war es nun möglich, die an der Tat/TAR-Bindung beteiligten Aminosäuren von EIAV-Tat zu bestimmen. Es zeigte sich, dass von den Tat/TAR-Wechselwirkungen die Aminosäuren Asparagin-34, Leucin-39, Cystein-40, Phenylalanin-41, Serin-44, Glycin-46, Isoleucin-47, Alanin-52, Leucin-54, Arginin-55, Lysin-56, Asparagin-58, Isoleucin-65 und Glutamin-66 betroffen sind. Bei diesem Bereich handelt es sich um Teile der Core- und die gesamte ARM-Region (vgl. Abb. 1.7, Seite 11).

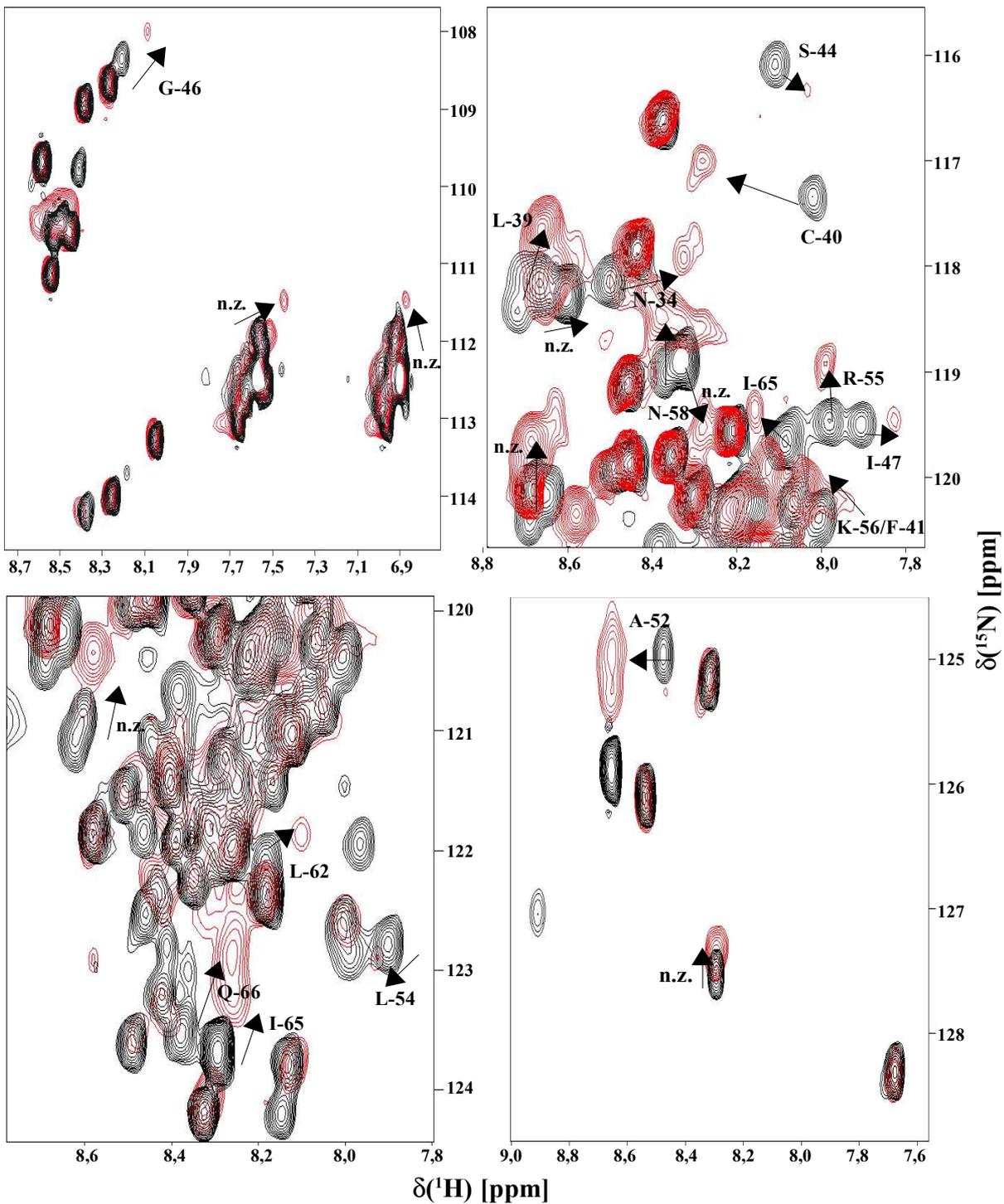


Abb. 3.30: ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren von ^{15}N -EIAV-Tat mit und ohne TAR-RNA

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus dem ^{15}N - ^1H -HSQC von ^{15}N -EIAV-Tat. In Schwarz ist das Spektrum von oxidiertem Tat ohne Bindungspartner und in Rot von an TAR-RNA gebundenem reduziertem Protein dargestellt. Es sind deutliche Veränderungen zu erkennen (Pfeile, vgl. Kap. 2.19.3), die sich hauptsächlich auf den Bereich der Aminosäuren Leucin-39 bis Glutamin-66 erstrecken. Die Signale, die bei der Zugabe von Reduktionsmittel verschwanden (vgl. Abb. 3.25), tauchen hier teilweise verschoben wieder auf. n.z.: nicht zugeordnet.

Während sich diese Komplexbildung nur geringfügig auf die Imino-Signale der TAR ausgewirkt hatte, zeigte das ^{15}N - ^1H -HSQC von EIAV-Tat deutlichere Verschiebungen der Resonanzen. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass EIAV-Tat ohne die Beteiligung weiterer Bindungspartner an TAR-RNA bindet.

3.5.1.2 Wechselwirkungen zwischen EIAV-Tat und hCycT1_V29L

Selbst nach der Optimierung der Pufferbedingungen konnte hCycT1_V29L nicht höher als 80 μM konzentriert werden (vgl. Kap. 3.1.1.3). Da diese Konzentration für die strukturelle Charakterisierung eines 272 Aminosäuren großen Proteins mittels NMR viel zu gering ist, wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung der Wechselwirkungen mit EIAV-Tat gelegt.

Bei der Zugabe von lyophilisiertem Tat zu einer 80 μM hCycT1_V29L-Lösung fielen beide Proteine jedoch aus. Deshalb wurden 2,5 ml einer 20 μM hCycT1_V29L-Lösung mit NMR-Puffer (50 mM K-Phosphat, 4 mM DTT, pH 6,4) bis auf 24 ml aufgefüllt und 1 ml einer 50 μM ^{15}N -EIAV-Tat-Lösung zugegeben, so dass beide Proteine in einem 1:1-Verhältnis mit jeweils ca. 2 μM in Lösung vorlagen. Diese Probe wurde in einer Centrikon-Kammer (Füllvolumen: max. 2 ml; Ausschlussgrenze 3,0 kDa) konzentriert, wobei zunächst 1 ml durch die Membran zentrifugiert wurde. Danach wurde das Zentrifugat verworfen, die Probe wieder auf 2 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. So wurde weiter vorgegangen, bis schließlich die gesamten 25 ml auf ein Volumen von 500 μl eingengt waren. Die errechnete Konzentration beider Proteine war demnach 100 μM , was für die Messung eines HSQC-Spektrums ausreichend war.

Dennoch schien im Laufe der Prozedur Protein ausgefallen zu sein, so dass das Volumen der Probe nochmals auf 250 μl halbiert wurde. Die Probe wurde in einem Shigemi-Röhrchen vermessen, was schließlich zu einem auswertbaren ^{15}N - ^1H -HSQC führte (vgl. Abb. 3.31).

Die Auswertung dieses Spektrums zeigt, dass sich einige Resonanzen verschieben. Betroffen sind die Aminosäuren Leucin-42/-45, Alanin-52, Serin-53 und Leucin-75 sowie vier weitere – in der ^{15}N -Probe bisher nicht zugeordnete – Resonanzen. Hinzu kommen kleinere Verschiebungen der Signale von Glutamat-30, Alanin-64, Isoleucin-65 und Leucin-74. Die Bindungsregion von EIAV-Tat an hCycT1_V29L befindet sich offensichtlich im Bereich der Aminosäuren 42-58, was der Core-Domäne entspricht, betrifft aber auch Leucin-75 und wahrscheinlich Leucin-74. Da die Signale der Leucine -42, -45, -50, -54 und -62 im reduzierten Zustand verschwinden (vgl. Abb. 3.25) aber nicht alle wieder auftauchen, kann nicht abschließend entschieden werden, welche der vier Leucine an der Cyclin-Bindung beteiligt sind.

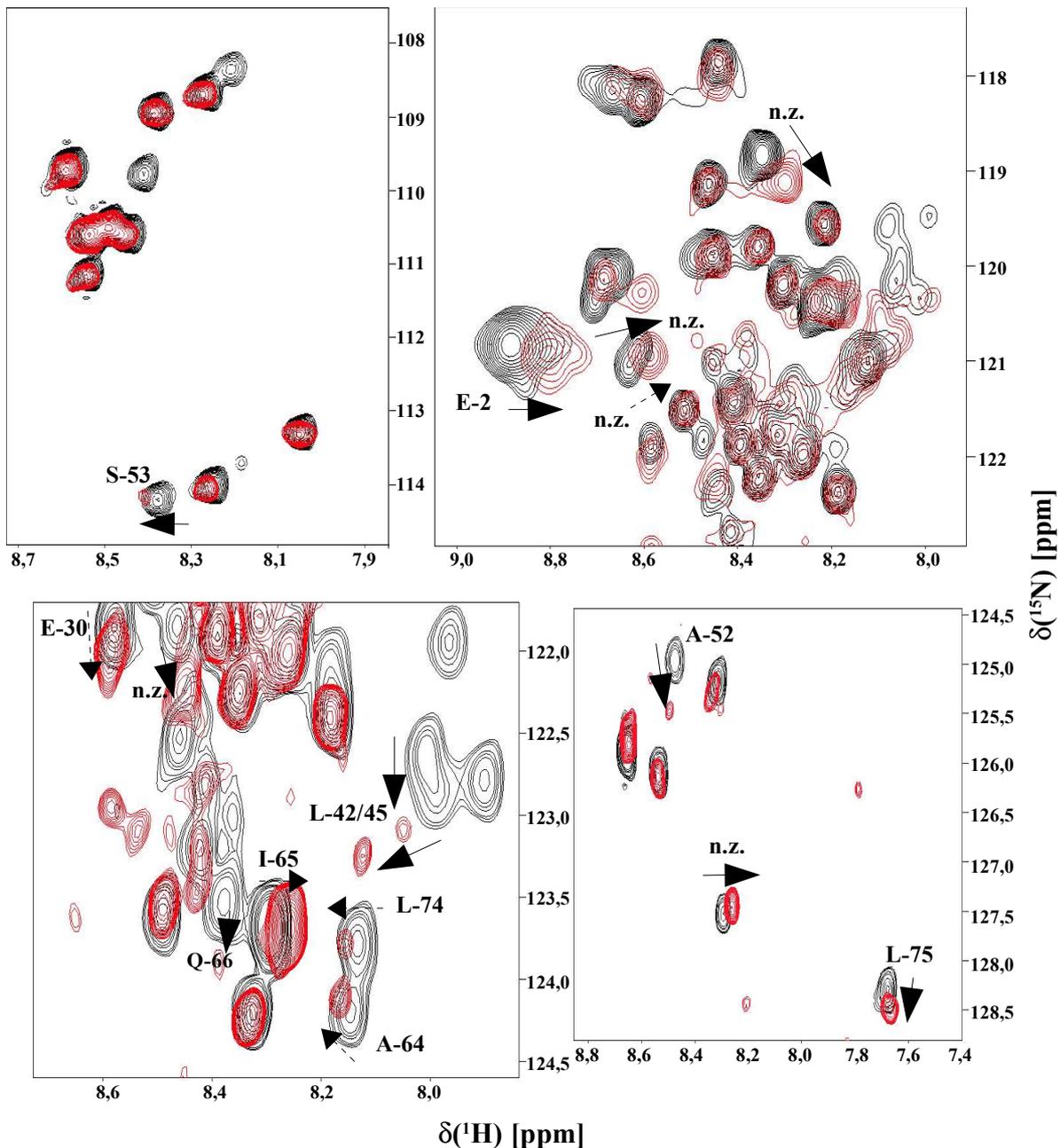


Abb. 3.31: ^{15}N - ^1H -HSQC von EIAV-Tat im Komplex mit hCycT1_V29L

Die von der Bindung betroffenen Aminosäuren zeigen leichte Veränderungen in ihren chemischen Verschiebungen. Die sichtbaren Änderungen sind jedoch geringer als bei der Bindung an TAR-RNA. An der Komplexbildung mit hCycT1_V29L scheinen vor allem Leucine beteiligt zu sein. So verschieben sich mindestens zwei Signale der Leucine-42, 45, 50 bzw. 54 genauso wie die von Leucin-75. Ebenso sind auch noch weitere Aminosäuren betroffen: Alanin-52, Serin-53 und vier weitere Aminosäuren, deren Signale bisher nicht zugeordnet werden konnten. Hinzu kommen auch einige sehr kleine Verschiebungen (gestrichelte Pfeile), von denen Glutamat-30, Leucin-74, Alanin-64, Isoleucin-65 und ein nicht zugeordnetes Signal betroffen sind.

Das Signal von Glutamat-2 war in anderen Versuchen oft sehr schwach und breit, so dass die hier beobachtete Veränderung wohl nicht durch eine Bindung an Cyclin T1 zustande kommt. Insgesamt lässt sich anmerken, dass die Verschiebungen wesentlich schwächer ausfielen als bei der Bindung an TAR-RNA (vgl. Abb. 3.30). Möglicherweise war durch die langwierige Prozedur der Konzentration beider Proteine in Lösung hCycT1_V29L ausgefallen, so dass kein 1:1-Verhältnis mehr vorhanden war, sondern EIAV-Tat im Überschuss vorlag.

3.5.1.3 Wechselwirkungen zwischen EIAV-Tat und Mini_eCyc_45

Die Untersuchung eines Tat/CyclinT1-Komplexes erwies sich aufgrund der schlechten Löslichkeit von Cyclin T1 als sehr schwierig (vgl. Kap. 3.1.1.3). Es sollte deshalb die Bindung verschiedener Mini-Cycline an Tat untersucht werden.

Das synthetische Mini_eCyc_45 wurde – wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben – mit einer Konzentration von 1,8 mM in NMR-Puffer gelöst. ^{15}N -EIAV-Tat wurde im gleichen Puffer gelöst, und beide Komponenten wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit einer Endkonzentration von 600 μM gemischt.

Zur Analyse der Bindung von EIAV-Tat an Mini_eCyc_45 wurden 1D- ^1H -Spektren und ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren ausgewertet (vgl. Abb. 3.32 und Abb. 3.33). Diese geben keinen Hinweis auf eine Bindung; lediglich für die beiden Tryptophan- α -Resonanzen bei 10 ppm werden in Gegenwart von EIAV-Tat drei Resonanzen beobachtet.

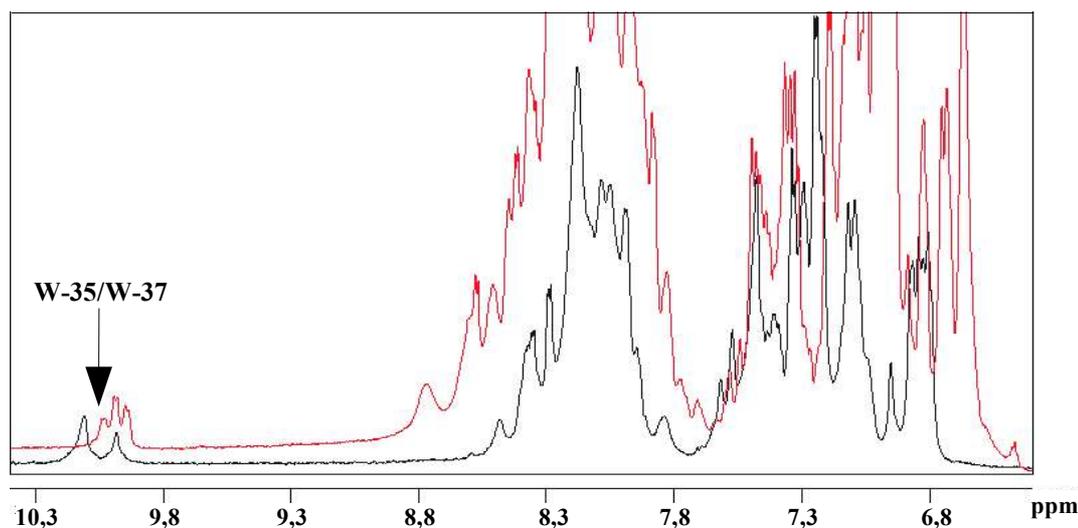


Abb. 3.32: 1D-Spektren von Mini_eCyc_45 mit und ohne EIAV-Tat

Die Bindungspartner wurden in einem 50 mM K-Phosphat-Puffer mit 2 mM Natriumdithionit bei pH 6,4 und 293 K gemessen. Die Signale der beiden Tryptophane bei 10 ppm spalten bei Zugabe von EIAV-Tat (rotes Spektrum) zu drei Signalen auf.

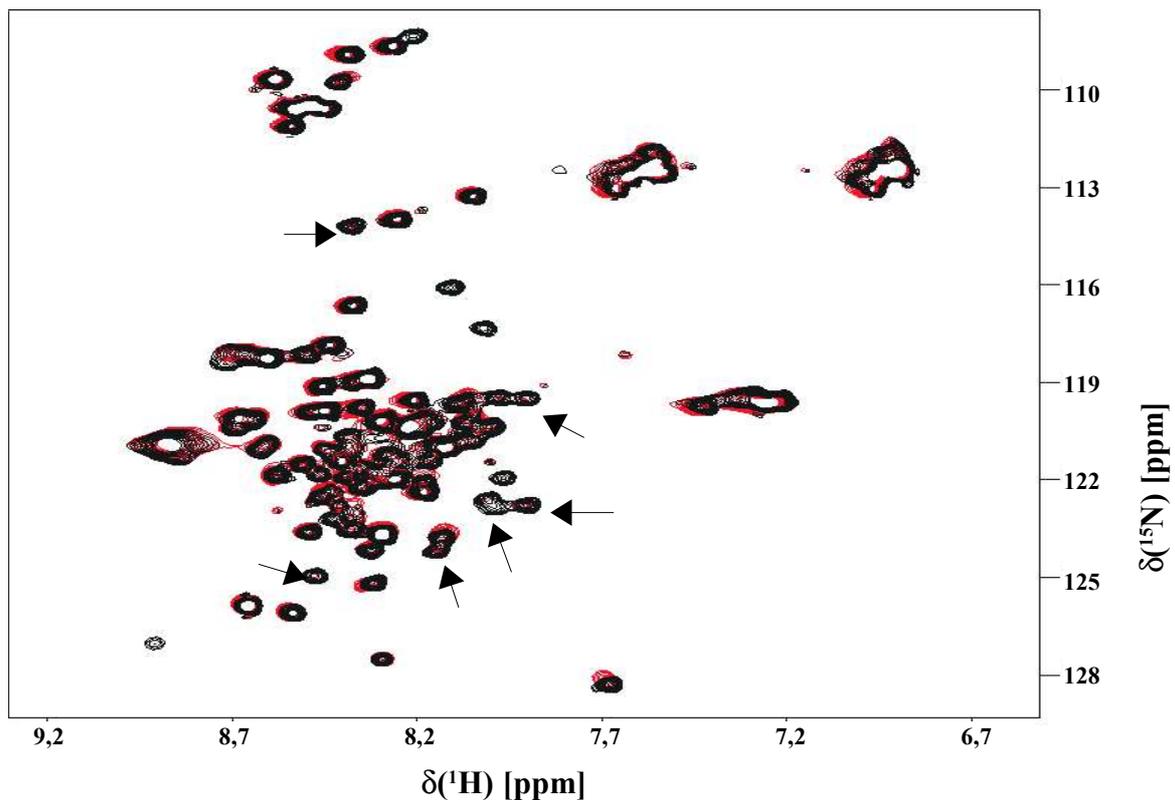


Abb. 3.33: ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren von ^{15}N -EIAV-Tat mit und ohne Mini_eCyc_45

Die Bindungspartner wurden in einem K-Phosphat-Puffer (50 mM, 2 mM Na-Dithionit, pH 6,4) bei 293 K gemessen. Beide Spektren sind identisch. Resonanzen, die unter Zugabe von Reduktionsmittel verschwanden (vgl. Abb. 3.25) und hier wieder auftreten (Pfeile), sind identisch zu den Signalen der freien oxidierten Form von EIAV-Tat.

3.5.1.4 Wechselwirkungen zwischen EIAV-Tat und Mini_eCyc_75

Jeweils 250 μl von 300 μM EIAV-Tat und Mini_eCyc_75 (in 50 mM K-Phosphat, 4 mM Na-Dithionit, pH 6,4) wurden gemischt und 10 % D_2O (v/v) zugegeben. Von dieser Probe wurden ein 1D- ^1H - und ein ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektrum aufgenommen (vgl. Abb. 3.34 und Abb. 3.35). Während im 1D-Spektrum deutliche Veränderungen zu erkennen sind, gibt das HSQC wenig Auskunft über eine Bindung der beiden Partner, da viele Signale verschwinden. Entweder wird eTat abgebaut, oder die Resonanzen verschwinden wegen einer Komplexbildung aufgrund einer veränderten Dynamik oder wegen konformationeller Heterogenität. Da keine neuen Signale erscheinen, ist ein Abbau eher unwahrscheinlich.

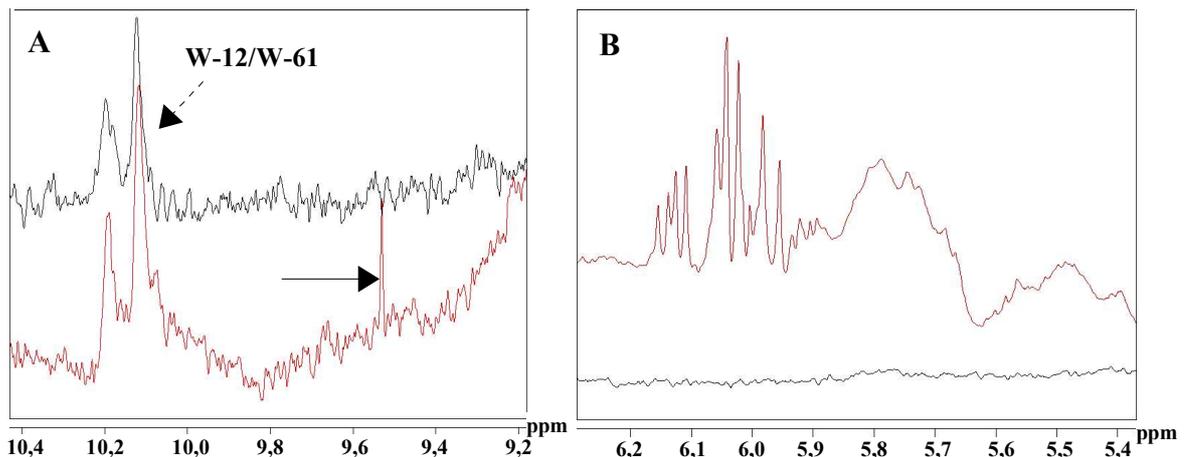


Abb. 3.34: 1D-Spektren von Mini_eCyc_75 und EIAV-Tat im Komplex

Im Gegensatz zur Bindung an Mini_eCyc_45, für die es keine Hinweise gab, scheint EIAV-Tat mit Mini_eCyc_75 (schwarzes Spektrum) einen Komplex (rotes Spektrum) zu bilden, was sich an der Neubildung mehrerer Signale erkennen lässt (Pfeil in Teilabbildung A und kompletter Ausschnitt in B). Die Tryptophane sind scheinbar nicht betroffen (gestrichelter Pfeil).

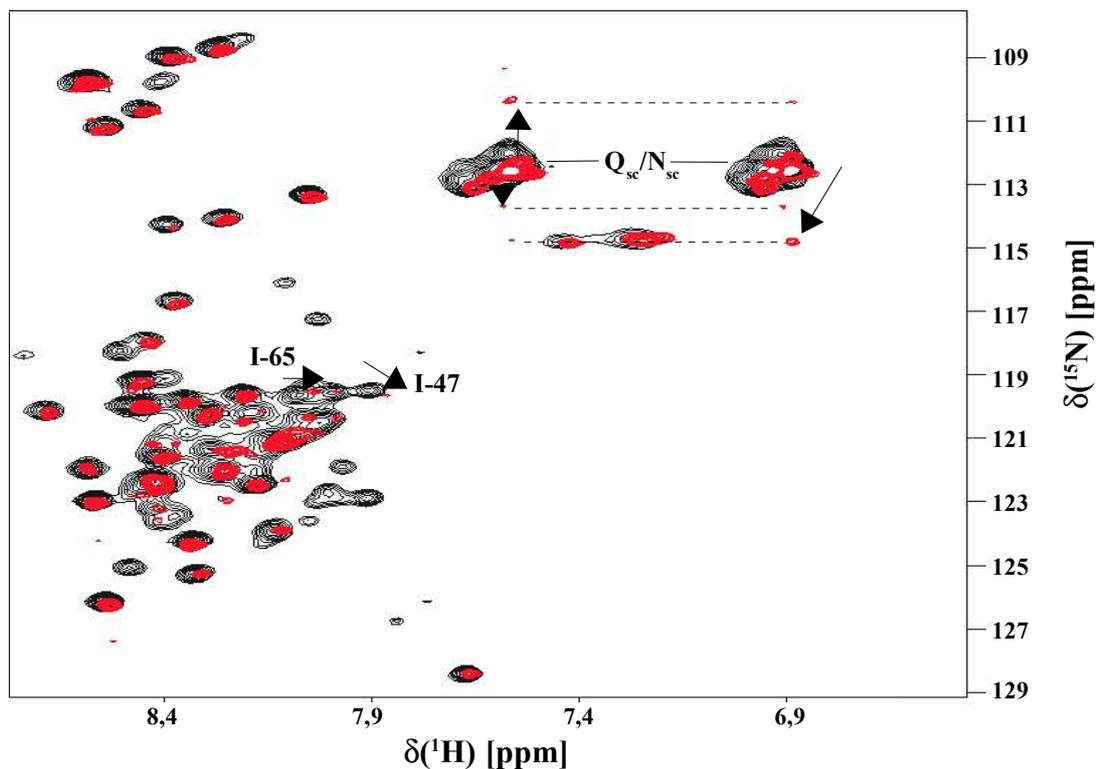


Abb. 3.35: ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren von EIAV-Tat im Komplex mit Mini_eCyc_75

Das ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektrum gibt wenig Hinweise auf eine mögliche Bindung von Tat an Mini_eCyc_75. Viele Signale verschwinden, tauchen aber nicht wieder an anderer Stelle des Spektrums auf. Mögliche Verschiebungen könnten Isoleucin-47 und Isoleucin-65 betreffen. Ebenso sind Seitenketten (sc; gestrichelte Linien) betroffen, was auf die Beteiligung von Glutaminen und/oder Asparaginen hindeutet.

3.5.1.5 Interaktionen von EIAV-Tat und dem HIV-Tat/TAR-Inhibitor TF53

Der Inhibitor der Tat/TAR-Bindung TF53 (vgl. Abb. 1.14, Seite 19) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Klimkait von der Universität Basel zur Verfügung gestellt. TF53 wurde in der hier eingesetzten Form als Bindungspartner von HIV-Tat identifiziert, der durch die Komplexbildung die TAR-RNA verdrängt (vgl. Kap. 1.4). Da aber der Inhibitor nur zu 10 % rein in Lösung vorlag, war es nicht sinnvoll, Tat und TF53 direkt zu vermischen, zumal ein solcher Versuch zum direkten Ausfallen des Proteins führte.

Deshalb wurde ein Dialysepuffer hergestellt (50 mM K-Phosphat, 4mM Na-Dithionit, pH 6,4), dem verunreinigtes TF53 zugegeben wurde. Die Konzentration an TF53 wurde so berechnet, dass sich im Dialysepuffer gerade soviel Inhibitor befand, wie benötigt wurde, um in 1 ml Probe mindestens ein 1:1-Verhältnis mit EIAV-Tat zu erreichen. So wurde z. B. 1 ml Probe mit 200 μ M EIAV-Tat in 100 ml Dialysepuffer mit 2-3 μ M TF53 über Nacht dialysiert (Ausschlussgrenze 1,0 kDa), so dass ungefähr von einem 1:1-Verhältnis bzw. von leichtem TF53-Überschuss ausgegangen werden konnte, falls TF53 spezifisch von Tat gebunden wird und so dem Puffer entzogen würde. Um nicht gebundene Verunreinigungen aus der TF53-Lösung, die ebenfalls die Dialysemembran passieren konnten, wieder zu entfernen, wurde die Probe (500-1000 μ l) ein zweites Mal gegen 100 ml NMR-Puffer (50 mM K-Phosphat, 4mM Na-Dithionit, pH 6,4) dialysiert (Ausschlussgrenze 1,0 kDa).

Die Probe wurde schließlich für eine NMR-Messung vorbereitet (vgl. Kap. 2.19.1), und in einem ^{15}N - ^1H -HSQC-Experiment vermessen. Alle Versuche vom Ansetzen des Dialysepuffers bis zum Transport der Probe im NMR-Röhrchen fanden im Dunkeln statt, da TF53 UV-sensitiv ist. Bei der Auswertung des Spektrums wird schnell deutlich, dass TF53 nicht nur an HIV-Tat, sondern auch an EIAV-Tat bindet (vgl. Abb. 3.36).

Die beteiligten Aminosäuren konnten wiederum mithilfe der Zuordnung aus Kap. 3.4 ermittelt werden: An den Wechselwirkungen zwischen EIAV-Tat und TF53 sind Asparagin-34, Leucin-39, Cystein-40, Leucin-42, Serin-44, Glycin-46, Isoleucin-47, Leucin-50, Alanin-52, Lysin-56, Leucin-62, Lysin-63, Isoleucin-65, Glutamin-66 und Glycin-68 sowie möglicherweise drei weitere Aminosäuren beteiligt bzw. betroffen. Diese 18 Aminosäuren sind nahezu vollständig identisch zu den an der Tat/TAR-Bindung beteiligten.

Vergleicht man die beiden ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren von EIAV-Tat mit TAR-RNA bzw. TF53, sind diese Ähnlichkeiten deutlich erkennbar (vgl. Abb. 3.37).

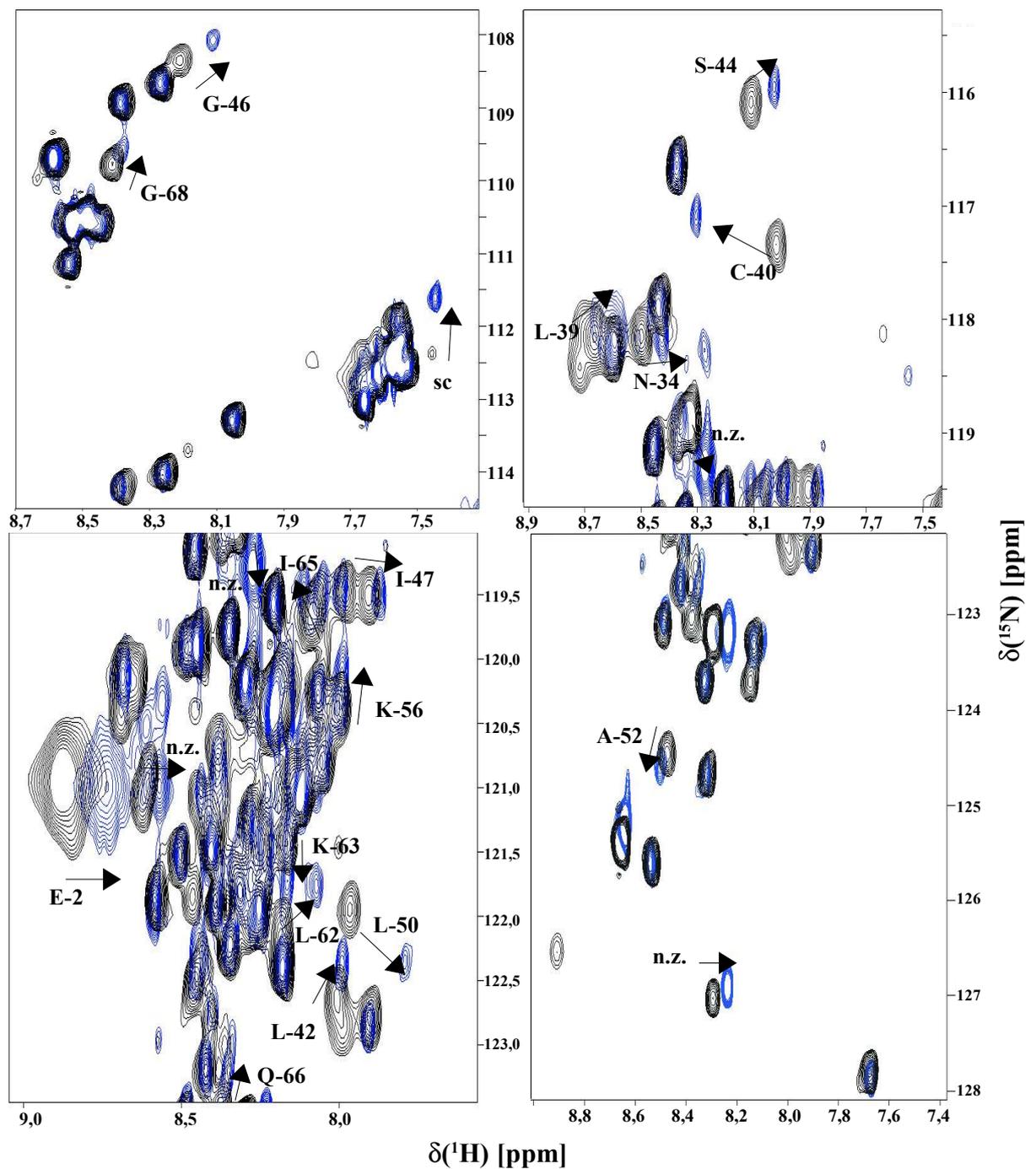


Abb. 3.36: ^{15}N - ^1H -HSQC von an TF53 gebundenem ^{15}N -EIAV-Tat

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus einem ^{15}N - ^1H -HSQC von ^{15}N -markiertem EIAV-Tat, zu dem der Inhibitor der Tat/TAR-Bindung, TF53 gegeben wurde (vgl. Text). Die Verschiebungen der Signale mehrerer Aminosäuren deuten darauf hin, dass TF53 auch an EIAV-Tat bindet. An der Komplexbildung sind beteiligt bzw. von dieser sind betroffen: Asparagin-34, Leucin-39, Cystein-40, Leucin-42, Serin-44, Glycin-46, Isoleucin-47, Leucin-50, Alanin-52, Lysin-56, Lysin-63, Isoleucin-65, Glutamin-66 und Glycin-68 sowie möglicherweise drei weitere Aminosäuren.

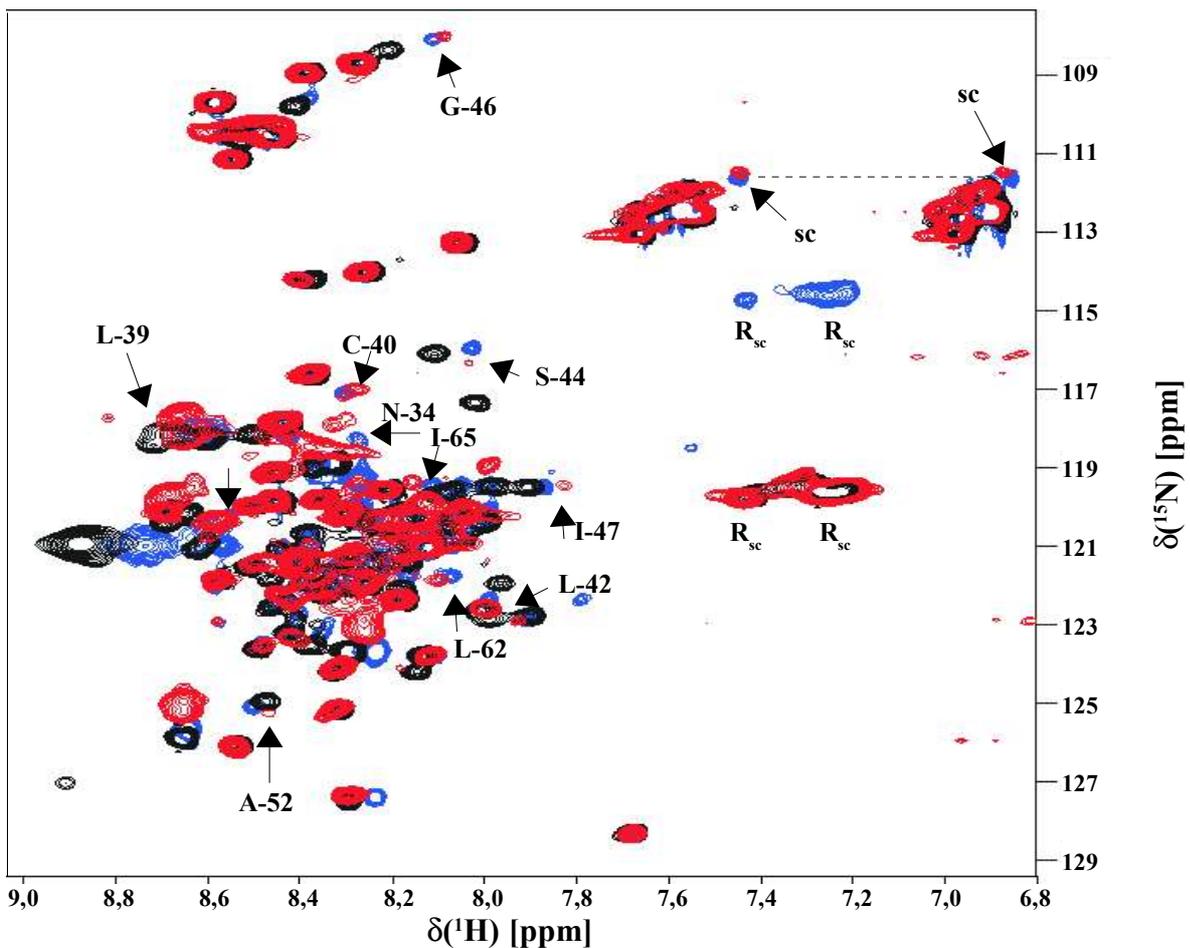


Abb. 3.37: Vergleich der ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren von ^{15}N -EIAV-Tat mit TAR-RNA bzw. TF53

Sowohl TAR-RNA (rotes Spektrum) als auch TF53 (blaues Spektrum) binden an gleiche Aminosäuren von EIAV-Tat (schwarzes Spektrum: ohne Bindungspartner). Die Bereiche, die sich bei beiden Komplexen entsprechen, sind mit Pfeilen markiert (für Einzelheiten vgl. Haupttext sowie Abb. 3.30 und Abb. 3.35). Selbst bei den Seitenketten (sc) treten die gleichen Veränderungen auf. Unterschiede sind oft nur in Richtung und Stärke einzelner Veränderungen zu erkennen (z. B. bei S-44, I-47 und A-52). Die Arginin-Seitenketten (R_{sc}) sind aufgrund verschiedener Aufnahmeweiten und der Faltung ihrer Resonanzen in das spektrale Fenster unterschiedlich, was demnach nicht auf Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

Die Regionen von Tat, die von einer Bindung an TAR bzw. an TF53 betroffen sind, entsprechen sich also – wenn auch nicht ganz – so doch zum größten Teil. Somit sollte der HIV-spezifische Inhibitor TF53 auch die Bindung von EIAV-Tat an EIAV-TAR inhibieren können. Eine Bindung des Inhibitors an oxidiertes Protein konnte nicht beobachtet werden: Die Spektren von nicht reduziertem EIAV-Tat mit und ohne Zugabe von TF53 waren absolut identisch.

3.5.2 Wechselwirkungen von EIAV-Tat, EIAV-TAR und Mini_eCyc_45

Ternäre Komplexe von EIAV-Tat mit TAR und Cyclin T1 sind laut der geltenden Meinung wesentlich stabiler und bedingen eine höhere Bindungsaffinität der einzelnen Partner untereinander als binäre Komplexe (Zhang et al., 2000). Leider ist aber die strukturelle Untersuchung mittels NMR aufgrund der bereits beschriebenen Instabilität von Cyclin T1 bisher nicht gelungen.

Möglicherweise können diese ternären Komplexe mithilfe der verkürzten Cyclin-Varianten dargestellt werden.

Ein binärer Komplex zwischen EIAV-Tat und Mini_eCyc_45 konnte nicht direkt nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.5.1.3). Darum wurde versucht, beide Komponenten mit EIAV-TAR zu mischen, um die Bindung aller Partner untereinander durch die Ausbildung eines ternären Komplexes zu stabilisieren. Dafür wurden 400 μ l einer 150 μ M RNA-Probe mit 100 μ l der 600 μ M Protein/Peptid-Probe aus Kapitel 3.5.1.3 gemischt, so dass ein RNA:Protein/Peptid-Verhältnis von 1:1 entstand. Die Probe wurde für die NMR-Messung vorbereitet, und es wurden ein 1D- und ein HSQC-Spektrum aufgenommen. Der Vergleich des 1D-Spektrums mit den Spektren der TAR-RNA ohne Bindungspartner und im Komplex mit EIAV-TAR zeigt Verschiebungen der Iminoprotonen-Resonanzen (vgl. Abb. 3.38 A). Vor allem das Signal von Guanin-23 ist stark Tieffeld verschoben. Genauso sind aber wieder die artifiziellen Signale der Nukleotide mit den zusätzlich auftretenden Wasserstoffbrücken betroffen. Ein deutlicher Unterschied zu dem binären Komplex mit EIAV-Tat sind hier allerdings die Signalintensitäten. Die nicht zugeordneten Signale bleiben in ihrem Verhältnis relativ gleich, fast alle anderen werden jedoch wesentlich schwächer. Andere RNA-spezifische Signale zwischen 5,2 und 6,1 ppm sind zwar auch von Verschiebungen betroffen, bleiben in ihrer Intensität aber erhalten (vgl. Abb. 3.38 B); lediglich die Linien verbreitern sich. Möglicherweise ist die zusätzliche Bindung von Mini_eCyc_45 derart, dass sich in einem eventuell vorhandenen ternären Komplex die RNA-Struktur allgemein verändert und im Speziellen die Wasserstoffbrücken teilweise aufbrechen, was sich logischerweise weniger auf die artifiziellen Signale auswirken würde, da sie am weitesten von der postulierten Bindestelle am Loop der TAR entfernt sind.

Außerdem kann beobachtet werden, dass die kleiner werdenden Signale der anderen Imino-Protonen keiner Veränderung unterliegen, obwohl dies im binären Komplex mit EIAV-Tat bei Uracil-5, Uracil-18, Guanin-17 und Guanin-21 der Fall war. Scheinbar sind nur noch die vorhandenen Wasserstoffbrücken zu sehen, die aber hauptsächlich von ungebundenen RNA-Molekülen beigesteuert werden.

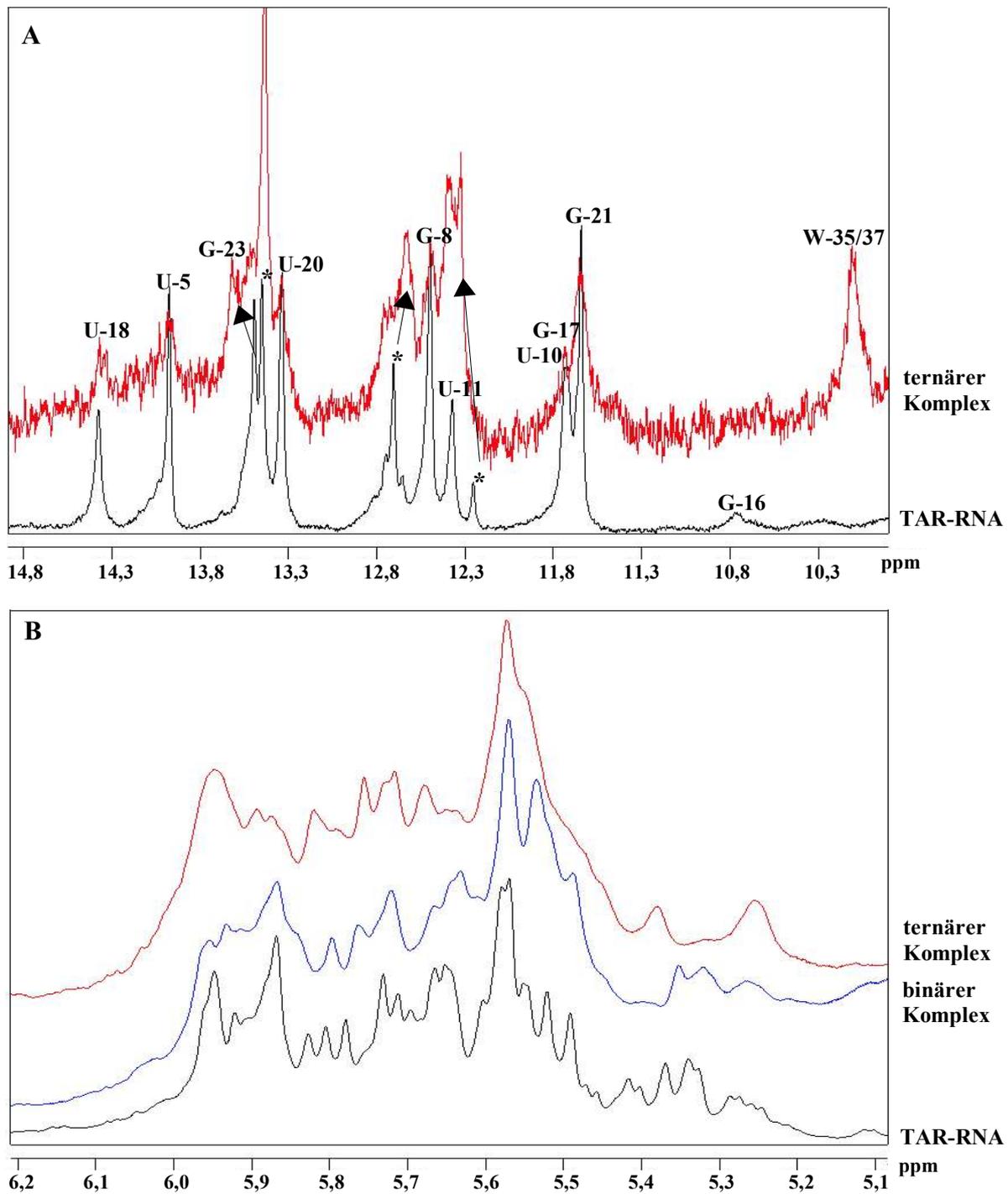


Abb. 3.38: 1D-NMR-Spektren von TAR-RNA im Komplex mit EIAV-Tat und Mini_eCyc_45

Der Vergleich mit den Spektren der TAR-RNA ohne Bindungspartner (schwarz) und im binären Komplex mit EIAV-Tat (blau) zeigt, dass sich die Ausbildung eines ternären Komplexes (rotes Spektrum) auf die chemischen Signale der Imino-Protonen der TAR-RNA (A) und auf weitere RNA-Signale zwischen 5,2 und 6,1 ppm (B) auswirkt. So ist scheinbar Guanin-23 an der Bindung beteiligt oder von dieser betroffen. Überraschenderweise verändern sich die Verhältnisse der Signalintensitäten der Iminos erheblich (A). In Teilabbildung A erscheint zusätzlich das Signal eines Tryptophan-Ringes von Mini_eCyc_45 bei 10,1 ppm.

Im HSQC-Spektrum von EIAV-Tat im ternären Komplex lassen sich nur zwei zusätzliche Veränderungen erkennen, die von Leucin-39 und Isoleucin-47 (vgl. Abb. 3.39).

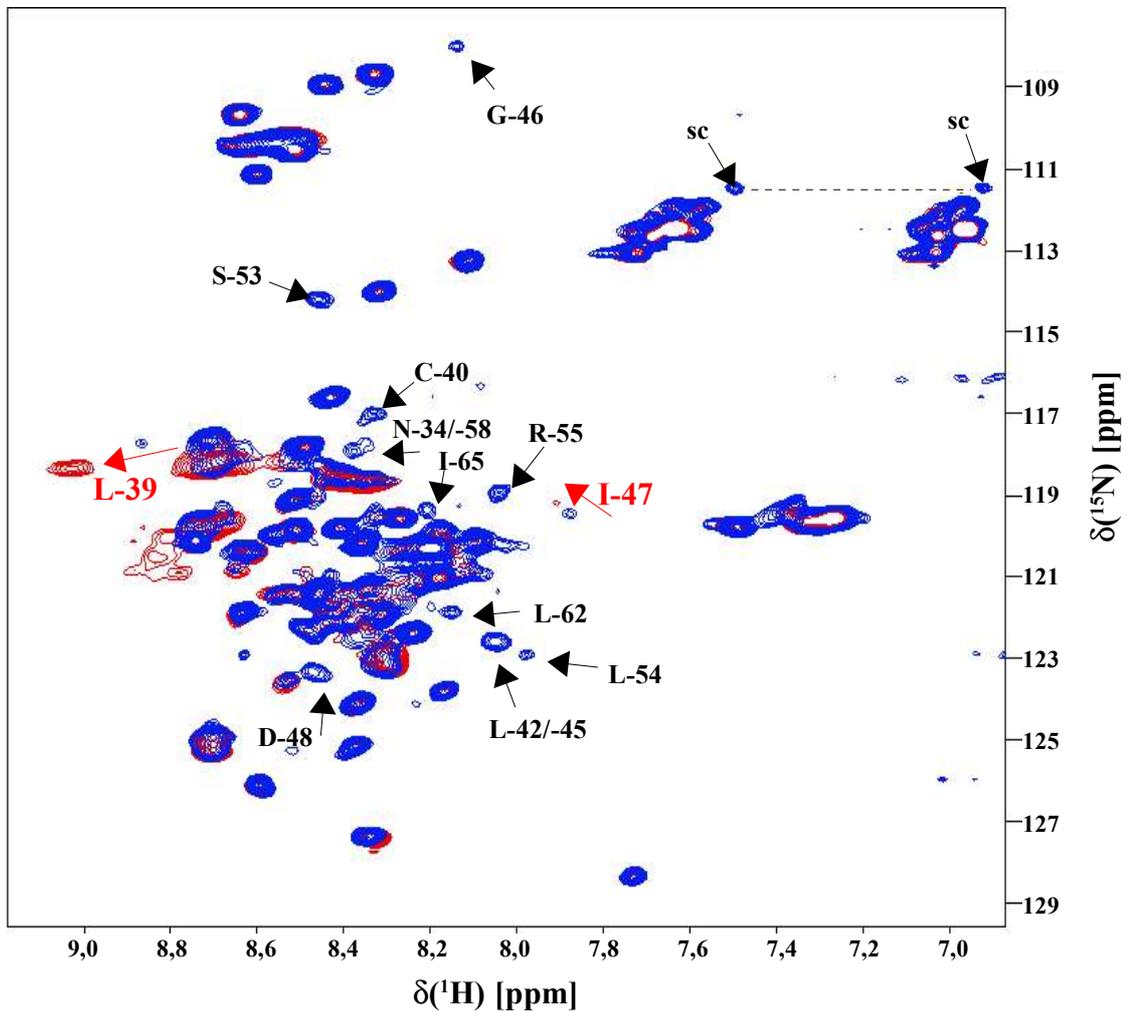


Abb. 3.39: ^{15}N - ^1H -HSQC von EIAV-Tat in Lösung mit TAR und Mini_eCyc_45

Die Abbildung zeigt den Vergleich der Spektren von ^{15}N -EIAV-Tat mit TAR-RNA (blau) bzw. mit TAR-RNA und Mini_eCyc_45 (rot) bei einer Konzentration von jeweils $120\ \mu\text{M}$. Auffällig ist, dass mehrere Signale, die bei Bindung an die TAR-RNA noch vorhanden sind, bei der Zugabe von Mini_eCyc_45 verschwinden (Pfeile), obwohl insgesamt die Signal-Intensitäten erhalten bleiben. Die Bindung des Peptids scheint sich nur auf Leucin-39 und Isoleucin-47 sichtbar auszuwirken (rote Pfeile).

Verschiebungen, die bereits bei der Bindung an TAR-RNA auftraten, erscheinen wieder, andere dagegen – insgesamt 13 – verschwinden vollständig. Möglicherweise sind diese Aminosäuren von einer Komplexbildung zwar betroffen, im HSQC aber nicht mehr beobachtbar (vgl. Abb. 3.39).

Auch auf der Basis von Mini_eCyc_45 war eine Analyse der Komplexbildung möglich. Denn anhand der Signale der beiden Tryptophane lässt sich möglicherweise auch eine Bindung und deren Auswirkungen erkennen. Diese Signale waren ja bereits bei der Zugabe von EIAV-Tat zu Mini_eCyc_45 in drei Signale aufgespalten.

Bei der Zugabe von TAR-RNA zeigt sich nur noch ein einziges Signal, das zudem wieder verschoben erscheint (vgl. Abb. 3.40). Die Bildung eines ternären Komplexes kann also auch auf der Basis von Mini_eCyc_45 beobachtet werden, bringt aber keine zusätzlichen Erkenntnisse. Diese wären möglicherweise mit einem einfach oder doppelt markierten Mini_eCyc_75 erhältlich.

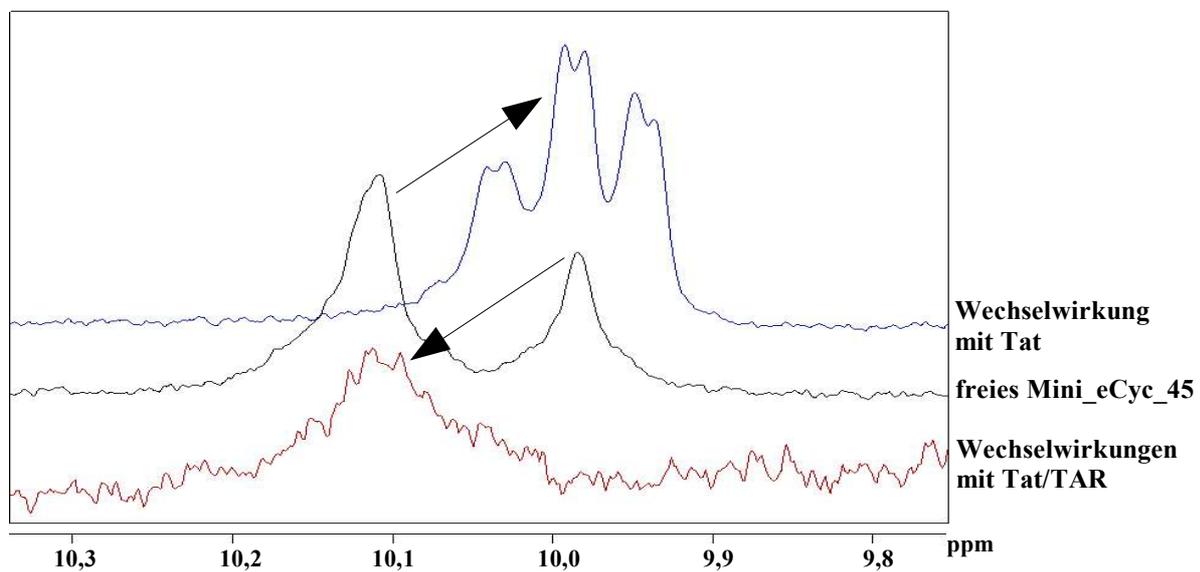


Abb. 3.40: Auswirkungen der Tat/TAR-Zugabe auf die Tryptophan-Signale von Mini_eCyc_45

Waren die Indolring-NH-Signale der beiden Tryptophane bei Bindung an EIAV-Tat zu drei Signalen aufgespalten, so erscheint im ternären Komplex mit EIAV-Tat und TAR-RNA nur noch ein Signal, das zudem wieder verschoben ist. Konzentrationen von Mini_eCyc_45: 1,8 mM (schwarzes Spektrum), 600 μ M (blaues Spektrum), 120 μ M (rotes Spektrum).

Zusammenfassend kann also vermutet werden, dass EIAV-Tat, TAR-RNA und Mini_eCyc_45 miteinander wechselwirken, was sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene gezeigt werden konnte.

Die Untersuchung weiterer ternärer Komplexe sollte dazu beitragen können, diese Ergebnisse zu bestätigen. Aufgrund der geringen Stabilität von hCycT1_V29L und der noch zu optimierenden Reinigung von Mini_eCyc_75 konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine weiteren ternären Komplexe untersucht werden.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung der im Antiterminationskomplex von EIAV auftretenden Wechselwirkungen im Vordergrund. Dabei stellen vor allem das Tat-Protein und die TAR-RNA als virale Faktoren sowie das Cyclin T1-Protein als Wirtsfaktor die wichtigsten Bindungspartner des gesamten Komplexes (vgl. Kap. 1.3). Sie bilden einen ternären Komplex, der alleine für sich *in vitro* untersucht werden kann, ohne dass weitere Bindungspartner des *in vivo* auftretenden Komplexes vorhanden sein müssen (Zhang et al., 2000). Die Ähnlichkeit zum Antiterminationskomplex von HIV-1 (vgl. Kap. 1.3) bedingt zudem die Wichtigkeit des EIAV-Systems und dessen Charakterisierung. Besonders interessant wird dieses System aber gerade durch die Unterschiede zu anderen in Lentiviren auftretenden Komplexen (vgl. Abb. 1.5, Kap. 1.3), die für EIAV einen eigenen Mechanismus der Komplexbildung zwischen Tat, TAR und Cyclin T1 erwarten lässt als beispielsweise für HIV-1.

Nachdem für die beiden viralen Faktoren Tat und TAR strukturelle Daten vorliegen (vgl. Kap. 1.3.1.1 und 1.3.1.2), gibt es für Cyclin T1 nur wenige Hinweise auf die Struktur und einige Daten zu den an der Komplexbildung beteiligten Aminosäuren, die sich hauptsächlich in den terminalen Helices des Proteins befinden (vgl. Abb. 1.13, Kap. 1.3.2). Aber auch für einen binären Komplex einzelner Partner untereinander existieren bisher kaum Daten, da beispielsweise davon ausgegangen wurde, dass EIAV-Tat und TAR alleine nicht binden (Willbold et al., 1998), sondern nur bei gleichzeitiger Bindung an Cyclin T1 auch ein Komplex mit TAR-RNA zustande kommt (Taube et al., 2000).

Ein wichtiger Punkt ist demnach die Produktion eines Cyclin T1, das *in vitro* mit den beiden anderen Partnern einen Komplex bildet. Da die Mindestlänge eines aktiven Cyclin T1-Proteins von den ursprünglich 726 auf 272 Aminosäuren eingegrenzt werden konnte (vgl. Kap. 1.3.2), wurde zunächst versucht, ein Cyclin T1(272 Δ) unter Laborbedingungen zu reinigen (vgl. Kap. 3.1.1.3 und 3.1.2).

Im Anschluss daran konnten NMR-spektroskopische Untersuchungen erste strukturelle Daten liefern. Die Kernresonanzspektroskopie bietet dabei den Vorteil, in Lösung arbeiten zu können, so dass in einer Probe sowohl einzelne Bindungspartner als auch im direkten Anschluss daran eine Komplexbildung charakterisiert werden können. Leider werden für die NMR-Spektroskopie wesentlich höhere Konzentrationen benötigt ($> 0,2$ mM) als z. B. für die häufig verwendeten Gelretardations-Experimente (nano- bis mikromolarer Bereich, z. B. Kwak et al., 1999; Wimmer et al., 1999; Garber et al., 2000).

4.1 Unterschiedliche Ansätze zur Reinigung von Cyclin T1

Die Reinigung von Cyclin T1 (272Δ) erfolgt in der Regel als Fusionsprotein mit beispielsweise *GST-tag* (z. B. Ivanov et al., 1999; Kwak et al., 1999; Garber et al., 2000; Kiernan et al., 2001; Taube et al., 2002). Da aber vor allem große Anhänge wie der *GST-tag* bei NMR-Messungen stören würden bzw. das Protein einer Spaltung unterzogen werden müsste, die als zusätzlicher Reinigungsschritt mit einem Verlust an Protein einhergeht, wurde bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit von Frau Dr. Silke Hoffmann die Reinigung von wt-hCycT1 über eine Butyl-Sepharose optimiert.

Aufgrund der Ähnlichkeit von hCycT1 und eCycT1 (vgl. Abb. 3.5, Seite 52) sollte letzteres ebenfalls über eine Butyl-Sepharose gereinigt werden.

4.1.1 Reinigung verschiedener Cyclin T1 (272Δ)-Proteine

Bei der Expression von eCycT1 ergaben sich kaum Unterschiede zum humanen Protein, das unter Standardbedingungen (37 °C, 3-4 h Induktion mit 1 mM IPTG) exprimiert werden konnte. Unter diesen Bedingungen wurde zwar nur eine geringe Expression festgestellt, eCycT1 konnte aber in ausreichender Menge im löslichen Überstand gefunden werden. Eine geringe Expressionsrate wurde zudem auch bei hCycT1 festgestellt.

Rekombinantes eCycT1 ist instabiler als hCycT1 und lässt sich nicht konzentriert reinigen

Die Induktion mit 2 mM IPTG in einem *E. coli* Tuner-Stamm stellte sich schließlich als optimal heraus (vgl. Abb. 3.6 A, Seite 53). Dabei war von Vorteil, dass die Zellen des Tuner-Stammes sehr effizient IPTG aufnehmen, das für die Induktion der Expression dem Kulturmedium zugegeben wurde. Dennoch verlief die Reinigung nicht erfolgreich. Es konnte hauptsächlich nur ein Protein mit einer Größe von ca. 24 kDa gereinigt werden (vgl. Abb. 3.6 B, Seite 53). Ein solches Fragment wurde auch - nach längerer Lagerung des Proteins - von hCycT1 gefunden (persönliche Mitteilung von Dr. S. Hoffmann). Daraus wurde geschlossen, dass es sich um ein Abbruch- bzw. Abbaufragment von eCycT1 handeln musste. Auch Reinigungsversuche unter veränderten Bedingungen (unterschiedliche pH-Werte, direkte Verarbeitung ohne jegliche Lagerung oder Minimierung der Ammoniumsulfat-Konzentration) waren nicht erfolgreich. Offensichtlich ist eCycT1 trotz der Ähnlichkeiten wesentlich empfindlicher als das humane Pendant. Dennoch konnte eine gering konzentrierte Probe von eCycT1 im CD-Spektrometer gemessen werden. Das Spektrum zeigt deutlich, dass eCycT1

ein hauptsächlich α -helikales Protein ist (vgl. Abb. 3.8, Seite 55), was im Einklang mit der aktuellen Literatur steht (Taube et al., 2000).

Da das Protein für NMR-Untersuchungen aber in hohen Konzentrationen gelöst werden muss und für die vorliegende Arbeit zudem mit anderen Biomolekülen in Verbindung treten sollte, um einen möglichst stabilen Komplex zu bilden, wurde nicht weiter an der Reinigung von wt-eCycT1 gearbeitet. Mit der Reinigung von His-tagged eCycT1 bzw. der Klonierung einer hCycT1-Mutante, die ebenfalls an EIAV-Tat bindet (Taube et al., 2000), standen noch weitere Optionen offen, die erfolgsversprechender waren.

His-tagged eCycT1 kann nur in geringer Konzentration erhalten werden

Das an einen His-tag gebundene eCycT1 verhielt sich stabiler als das wt-Protein. Dennoch war schon während der Reinigungsprozedur erkennbar, dass auch His-eCycT1 nicht stabil in Lösung bleiben würde. Je nach Konzentration eluierte das Protein in bereits ausgefallenem Zustand von der Säule. Das Protein, das in Lösung verblieb, konnte jedoch nach der Konzentrierung nicht längere Zeit aufbewahrt werden, ohne auszufallen.

Eine Gefriertrocknung schied von vorne herein aus, da sich bei den Vorversuchen mit hCycT1 bereits gezeigt hatte, dass dieses nach dem Lyophilisieren gar nicht mehr gelöst werden konnte (pers. Mitteilung von Dr. S. Hoffmann).

Ein weiteres Problem war das Abspalten des His-tag, der sich weder in Lösung noch direkt auf der Säule vom Protein trennen ließ. Weil ein terminaler Anhang aufgrund der Wichtigkeit von Amino- und Carboxyterminus des CycT1 bei der Komplexbildung besonders stören würde (vgl. Kap. 1.3.2), wäre ein Einsatz des Fusionsproteins für die NMR-Messungen - abgesehen von der geringen Stabilität des Proteins in Lösung - wenig sinnvoll gewesen. Da die Problematik der Instabilität des Proteins auch nach gelungener Abspaltung des Anhangs eher größer als kleiner gewesen wäre, schien das His-eCycT1-Protein ebenso keine guten Ansatzpunkte für strukturelle Untersuchungen mit NMR-Spektroskopie zu bieten.

Möglicherweise wäre ein an einen Komplexpартner gebundenes Cyclin T1 stabiler. So könnte z. B. eine Bindung an Tat oder auch an CDK9 hydrophobe Stellen des Proteins abdecken, so dass die Löslichkeit verbessert werden würde. So konnten bereits Strukturen von mehreren komplexierten Cyclinen ermittelt werden (vgl. PDB-Einträge). Die Struktur von Cyclin H ist eine der wenigen, die bisher von freiem Cyclin ohne Komplexpартner ermittelt werden konnte (Kim et al., 1996). Diese Situation unterstreicht die Problematik im labortechnischen Umgang mit ungebundenen Cyclinen.

Rekombinantes hCycT1_V29L bietet eine Alternative zu eCycT1

Die logische Konsequenz der nicht zufrieden stellenden Reinigung und Konzentrierung von eCycT1 war der Versuch, eine Mutante von hCycT1 zu klonieren, die anstelle des Valin-29 ein Leucin trägt. Diese Mutante war als Bindungspartner von EIAV-Tat ermittelt worden, mit dem es einen aktiven Komplex bildet (Taube et al., 2000).

Die für die Einführung der V29L-Mutation eingesetzte Zwei-Schritt-PCR-Mutagenese (vgl. Abb. 3.1, Seite 49) erwies sich als gute Lösung. Als Ausgangs-DNA wurde hCycT1-DNA verwendet (Bieniasz et al., 1998), um sicher zu gehen, dass die Aminosäuren-Sequenz der des bereits im Labor gereinigten hCycT1 entspricht. Eine Sequenzierung bestätigte die erfolgreiche Mutation an der Stelle 29.

Die Induktion verlief erfolgreich, wobei die Expressionsrate für hCycT1 typisch gering war. Es konnte selbst mit verschiedenen Optimierungsversuchen keine höhere Rate erreicht werden. Weder die Variation der Temperatur oder der IPTG-Konzentration noch eine Expression in *P. pastoris* führten zu höheren Ausbeuten. Im Laufe der Reinigung stellte sich eher die Konzentrierung der Proteinprobe als Problem heraus, so dass eine weitere Optimierung der Expressionsrate keinen zusätzlichen Vorteil gebracht hätte.

Rekombinantes hCycT1_V29L kann mittels Ammoniumsulfat-Fällung und einer HIC gereinigt werden

Die Zwei-Schritt-Reinigung mittels Ammoniumsulfat-Fällung und nachgeschalteter Butyl-Sephrose konnte bereits für die Reinigung von wt-hCycT1 erfolgreich eingesetzt werden.

Im ersten Schritt konnte das Protein durch die Zugabe von Ammoniumsulfat im 35%- und im 45%-Pellet gefällt werden, wodurch eine erste Anreicherung von hCycT1_V29L erreicht wurde (vgl. Abb. 3.4 A, Seite 51). Alle anderen, nicht gefällten Proteine blieben jedoch in Lösung und konnten so vor dem zweiten Reinigungsschritt entfernt werden.

Bei diesem zweiten Schritt - Reinigung über eine HIC - eluierte das Protein schließlich innerhalb des Isopropanol-Gradienten (vgl. Abb. 3.3 und Abb. 3.4 B, Seite 51), was von Vorteil war, denn die meisten anderen Proteine wurden schon durch den fallenden Ammoniumsulfat-Gradienten von der Säule gewaschen. Somit konnte gezeigt werden, dass Cyclin T1 auch ohne die üblichen Anhänge nativ gereinigt werden konnte.

Nach dieser Reinigung befand sich das Protein in einem Tris/HCl-Puffer mit ca. 10 % Isopropanol bei einem pH von 8,0. Solche Bedingungen sind aber für die NMR-Spektroskopie ungeeignet. Zum einen stört das Tris, da es selbst bei ca. 3,7 ppm ein sehr starkes Signal

bedingt, zum anderen ist der pH mit 8,0 zu hoch, um eine Komplexbildung mit RNA und Tat-Protein zu untersuchen. Deshalb musste das hCycT1_V29L gegen einen geeigneten NMR-Puffer (K-Phosphat, pH 6,4) dialysiert werden. Da aber die Instabilität der Cycline schon hinreichend bekannt war und sich der pI von hCycT1_V29L bei 7,4 befindet, wurde die Dialyse in mehreren Schritten vollzogen (vgl. Kap. 3.1.1.3).

Auf diese Weise konnte ein Ausfallen des Cyclins verhindert werden, was z. B. im Falle des His-tagged eCycT1 nicht gelungen war.

Gereinigtes hCycT1_V29L bleibt auch über längere Zeit unter Sauerstoff-Ausschluss stabil in Lösung

Aufgrund der schlechten Lagerfähigkeit und vor allem Löslichkeit von hCycT1 als lyophilisiertes Protein, musste zur Aufbewahrung von hCycT1_V29L eine Alternative gefunden werden. Denkbar war z. B. das Einfrieren der Proteinlösung durch das Eintropfen in flüssigen Stickstoff und die nachträgliche Aufbewahrung bei -80 °C. Da aber nach den Vorversuchen bekannt war, dass hCycT1 und eCycT1 durch Einfrieren und Auftauen Schaden nehmen, so dass Abbruchproteine entstehen, wurde eine schonendere Methode angewendet, bei der das Protein in Lösung bei 4 °C gelagert werden konnte. Dabei musste nach der Konzentrierung in einer Amicon-Kammer mit Stickstoff begast werden, um möglichst viel Sauerstoff zu verdrängen, der spätestens nach dem Abbau des zugegebenen DTT zur Oxidation des Proteins geführt hätte. Auf diese Art war es möglich das gereinigte Protein längere Zeit aufzubewahren, was aufgrund der aufwendigen Produktion durchaus sinnvoll war. Selbst mehrere Monate alte Proben enthielten noch gelöstes hCycT1_V29L.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die konzentrierte Reinigung von eCycT1 weder als Wildtyp noch als Histidin-Fusionsprotein möglich war. Beide Proteine waren sehr instabil und konnten nicht in einer für die NMR geeigneten Konzentration erhalten werden.

Die an EIAV-Tat bindende hCycT1-Mutante hCycT1_V29L erwies sich dagegen als wesentlich unempfindlicher, konnte allerdings auch nur begrenzt konzentriert werden.

Die schlechte Löslichkeit der exprimierten CyclinT1(272Δ)-Proteine stellt ganz offensichtlich das Hauptproblem dar. Möglicherweise könnte eine Verlängerung oder Verkürzung des Proteins zur Lösung des Problems beitragen. Da Cyclin T1 ursprünglich aus 726 Aminosäuren besteht (Wei et al., 1998), wäre es durchaus denkbar, dass die Verkürzung auf die ersten 272 Reste hydrophobe Bereiche freilegt, die normalerweise nicht Lösungsmittel exponiert sind, so dass deshalb die kurze Form des Proteins schlechter löslich ist. Die sukzessive Verlängerung

mit jeweils 10 Resten bis auf eine Größe von 352 Aminosäuren führte jedoch auch nicht zur Reinigung eines besser löslichen Cyclins (unveröffentlichte Ergebnisse).

Eine weitere Verkürzung von Cyclin T1 (272 Δ) ist allerdings mit der Inaktivierung des Proteins verbunden (Garber et al., 1998; Fujinaga et al., 1999; Ivanov et al., 1999), so dass dieser Weg ebenfalls versperrt war, es sei denn, eine verkürztes Peptid enthielte nur die für die Tat/TAR-Interaktion wichtigen Bestandteile und nicht die dafür verzichtbaren.

4.1.2 Verkürzte Cyclin T1-Varianten als Ersatz für Cyclin T1 (272 Δ)

Die Problematik bei der Reinigung der verschiedenen 272 Aminosäuren großen Cycline ließ vermuten, dass sich eine Komplexbildung mit EIAV-Tat oder gar mit Tat und TAR-RNA *in vitro* nur schwer beobachten lassen würde. Die aufwendige Konzentrations-Prozedur von hCycT1_V29L und ¹⁵N-markiertem EIAV-Tat bei der Herstellung eines binären Komplexes bestätigte diese Vermutung (vgl. Kap. 3.5.1.2). Es wäre wünschenswert, eine Cyclin T1-Variante zu besitzen, die zwar an EIAV-Tat bindet, aber wesentlich einfacher in ihrer Handhabung ist.

Peptide werden häufig in der Forschung eingesetzt, um z. B. die Struktur oder Interaktionen bestimmter Aminosäuren-Sequenzen mit anderen Proteinen oder Nukleinsäuren zu untersuchen (z. B. Mujeeb et al., 1994; Seewald et al., 1998). In den letzten Jahren konnten z. B. mit von Tat abgeleiteten Peptiden wichtige Erkenntnisse über die Komplexbildung mit TAR-RNA gewonnen werden (Long & Crothers, 1995; Huq et al., 1999a, 1999b; Wang et al., 1999; 2001; Tok et al., 2001). Gerade für die Verwendung bei NMR-gestützten Untersuchungen spielen Peptide eine wichtige Rolle (Klostermeier et al., 1997; Long & Crothers, 1999; Schärpf et al., 2000), da sie aufgrund ihrer Größe in den NMR-Spektren wenige und damit leichter zu unterscheidende Resonanzen aufweisen. Außerdem sind die meisten Peptide i.d.R. gut löslich, so dass die Aufnahme der Spektren und deren Auswertung enorm erleichtert werden.

Bekannt ist, dass sich die an der Tat/TAR-Bindung beteiligten Aminosäuren von Cyclin T1 sowohl am amino- als auch am carboxyterminalen Ende des 272 Aminosäuren großen Proteins befinden (Garber et al., 1998; Fujinaga et al., 1999; Taube et al., 2000). Demnach sollte eine verkürzte Variante beide Enden des Proteins enthalten. Diese müssten dann allerdings auf geeignete Weise miteinander verbunden werden.

Da die Termini wahrscheinlich aus α -Helices bestehen (vgl. Abb. 1.13, Kap. 1.3.2), wurde als Verbindungsstück ein Helix-Cap bzw. ein Turn zwischen die beiden Stücke konstruiert (vgl. Abb. 3.10, Seite 58 und Abb. 3.12, Seite 60), deren optimale Aminosäuren-Abfolge mit

Phenylalanin, Lysin, Serin und Glycin (FKSG-Linker) bzw. mit Glycin und Prolin (GP-Turn) ermittelt wurde (Dasgupta & Bell, 1993), wobei das Glycin überlappte. Für die Produktion eines solchen Konstruktes waren zwei Möglichkeiten denkbar. Entweder eine chemische Synthese oder eine Klonierung, Expression und Reinigung im eigenen Labor.

Bei einer Synthese würde man innerhalb kurzer Zeit über ein hochreines Peptid verfügen, das allerdings sehr teuer wäre und auf ein Minimum an Aminosäuren beschränkt sein müsste. Dagegen böte die Reinigung im Labor den Vorteil, dass das Peptid jederzeit produziert und mit Isotopen markiert werden könnte; eine Beschränkung der Anzahl an Aminosäuren wäre nicht nötig. Leider beansprucht die Etablierung einer Reinigung sehr viel Zeit, ohne dass ein positives Ergebnis – sprich die Herstellung eines reinen Proteins – gewährleistet werden kann.

Um die Vorteile beider Strategien nutzen zu können, wurde schließlich sowohl ein synthetisches Peptid bestellt (Mini_eCyc_45) als auch ein rekombinantes selbst produziert (Mini_eCyc_75).

Mini_eCyc_45 kann im Gegensatz zu Cyclin T1 in hoher Konzentration gelöst werden

Die Ableitung der Aminosäuren-Sequenz von Mini_eCyc_45 wurde anhand von Literaturdaten vorgenommen (Taube et al., 2000), um sicher zu gehen, dass die ausgewählten Aminosäuren denen entsprachen, die sich bei *in vivo*-Tests bereits als Bestandteil eines biologisch aktiven Cyclins herausgestellt hatten.

Da EIAV-Tat und eCycT1 wahrscheinlich über Leucin-Brücken miteinander verbunden sind (Derse & Newbold, 1993; Taube et al., 2000; vgl. Abb. 1.5, Seite 9), war es wichtig, dass die Leucine -29, -35, -44 und -45 von eCyclin T1 (272Δ) vorhanden waren. Weil sich auch mehrfach das konservierte Cystein-261 (vgl. Abb. 1.13, Seite 17) als wichtige Aminosäure herausgestellt hatte (Garber et al., 1998; Fujinaga et al., 1999), sollte es auf jeden Fall Bestandteil eines Mini-Cyclins sein. Flankierend zu diesen wichtigen Aminosäuren wurden jeweils 4-5 weitere Positionen mit einbezogen. Der FKSG-Linker setzte direkt vor dem Prolin-249 an, weil dieses laut Sekundärstrukturvorhersage nicht in eine α -Helix eingebunden sein würde. So konnte auf jeden Fall die gesamte carboxyterminale Helix mit einbezogen werden. Auf diese Weise kam eine Mindestlänge von 45 Resten zustande (vgl. Abb. 3.10, Seite 58). Eine solche Größe war für die chemische Synthese bereits schwierig, wurde aber dennoch erfolgreich von der Firma *Biosyntan* (Berlin) durchgeführt.

Die Löslichkeit des Peptids war sehr gut, so dass es mit einer Konzentration von 1,8 mM in NMR-Puffer gelöst werden konnte. Das Herausschneiden bzw. Weglassen der Aminosäuren

48-248 bewirkte also eine wesentlich bessere Löslichkeit, was zu erwarten war, denn in diesem Bereich befindet sich möglicherweise ein exponierter hydrophober Loop, der für die schlechte Löslichkeit des Cyclin T1 (272Δ) verantwortlich sein könnte. Damit stand zum ersten Mal ein CyclinT1-Derivat in ausreichender Konzentration zur Verfügung, dessen Wechselwirkungen mit EIAV-Tat und TAR-RNA mit NMR untersucht werden konnten.

Mini_eCyc_75 lässt sich in E. coli überexprimieren

Die begrenzte Aminosäurezahl von Mini_eCyc_45 bedingte nicht nur das Herausschneiden eines hydrophoben Teiles von eCyclin T1 (272Δ), sondern eben auch das zusätzliche Verkürzen von Amino- und Carboxyterminus (vgl. Abb. 3.10, Seite 58). Diese Notwendigkeit bestand bei der Herstellung eines rekombinanten Mini-Cyclins nicht. Deshalb wurden bei der Ableitung der Sequenz von Mini_eCyc_75 beide Termini komplett mit einbezogen, so dass die etwaige Ausbildung einer aminoterminalen Helix (vgl. Abb. 1.13, Seite 17) nicht durch das Fehlen einiger Aminosäuren gestört werden konnte (vgl. Abb. 3.12, Seite 60).

Der Mittelteil des Peptids mit dem FKSG-Linker war bereits für die Synthese von Mini_eCyc_45 optimiert worden, so dass die Sequenz für diesen Teil fast identisch war. Kleine Unterschiede ergaben sich nur durch die im Labor vorhandene eCyclin T1-DNA, die als Template für die PCR-Mutagenese eingesetzt wurde und deren Sequenz an zwei Stellen von der Mini_eCyc_45-Sequenz abwich (vgl. Abb. 1.12, Seite 16). Bei den zwei Varianten handelt es sich aber um in der Natur vorkommende Proteine, die beide aktiv sind (Bieniasz et al., 1999a; Taube et al., 2000).

Heparin-Sepharose ist ein geeignetes Material zur Reinigung von Mini_eCyc_75

Bei der Induktion von Mini_eCyc_75 (vgl. Abb. 3.15, Seite 63) fiel vor allem die wesentlich höhere Expressionsrate gegenüber eCyclin T1 (272Δ) auf. Somit war klar, dass dieses verkürzte Cyclin weder ungünstige Codons noch toxische Eigenschaften gegenüber *E. coli*-Zellen besitzt. Damit sind zwei wichtige Voraussetzungen gegeben, ein Protein routinemäßig zu exprimieren. Die dritte Voraussetzung für eine erfolgreiche Charakterisierung eines Proteins – die Herstellung eines reinen Proteins – konnte mit einer Reinigung über Heparin-Sepharose erzielt werden. Da *E. coli* selbst nur wenige basische Proteine produziert, war die Kationenaustauscher-Chromatographie die sinnvollste Wahl. Denn Mini_eCyc_75 hat einen theoretischen pI von 11,1 und verfügt als Komplexpartner von Tat und TAR wahrscheinlich über eine Nukleinsäure-Bindungsaffinität, die eine Bindung an Heparin zusätzlich begünstigen

würde.

Die Praxis bestätigte diese theoretischen Überlegungen; Mini_eCyc_75 wurde über eine Heparin-Säule gereinigt (vgl. Abb. 3.16, Seite 64) und konnte im Anschluss daran bis auf 300 μ M konzentriert werden (vgl. Abb. 3.17, Seite 65). Bei der Konzentration zeigte sich zwar, dass Mini_eCyc_75 nicht so sauber gereinigt werden konnte, wie es wünschenswert gewesen wäre. Dennoch war die Reinheit für spektroskopische Untersuchungen ausreichend, denn es konnte mittels 1D-NMR-Spektren gezeigt werden, dass Mini_eCyc_75 große Ähnlichkeit zum Mini_eCyc_45-Peptid besitzt (vgl. Abb. 3.19, Seite 67). Viel entscheidender war jedoch die gute Löslichkeit von Mini_eCyc_75, denn gerade die war bei der Reinigung von Cyclin T1 (272 Δ) der problematischste Schritt gewesen. Mit einer Konzentration von über 300 μ M eines zudem wesentlich kleineren Moleküls waren die Bedingungen für NMR-Messungen wesentlich verbessert worden.

Damit stand neben dem synthetischen ein rekombinantes Mini-Cyclin zur Verfügung, das unter etablierten Laborbedingungen produziert werden konnte, dessen Reinigung aber durchaus noch optimiert werden sollte, in dem z. B. der Salzgradient flacher oder als Stufengradient angewendet wird. Eine höhere Reinheit könnte auch durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt (Fällung oder anderes Säulenmaterial) erhöht werden, würde aber immer eine Verringerung der Ausbeute bedingen.

4.2 Herstellung der beiden Komplexpartner EIAV-Tat und TAR-RNA

Expression und Reinigung von EIAV-Tat waren bereits im Labor etabliert (Willbold, 1993) und mussten dementsprechend nur reproduziert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass EIAV-Tat sowohl unmarkiert als auch einfach (15 N) und doppelt (15 N und 13 C) markiert exprimiert und gereinigt werden konnte (vgl. Abb. 3.20, Seite 68). Es wurde dabei auf einen Klon zurückgegriffen, dessen Tat-Protein bereits in Aktivitätstests untersucht worden war (Rosin-Arbesfeld et al., 1994).

Die Produktion von TAR-RNA erfolgte in einer *In vitro*-Transkription, die genauso wie die Reinigung von EIAV-Tat bereits etabliert war und nur reproduziert werden musste (Willbold, 1993). Die Verlängerung der TAR-RNA um 3 Basenpaare (vgl. Abb. 3.26, Seite 76), die wegen der Erhöhung der Transkriptionsrate sinnvoll gewesen war, hatte keine Auswirkungen auf die Struktur der Nukleinsäure. Wichtige Hinweise auf die korrekte Faltung von RNA geben die Signale der Imino-Protonen zwischen 10,5 und 14,5 ppm. Der Vergleich mit der Zuordnung dieser Signale zu den jeweiligen Basen von Hoffmann & White (1995) ergab, dass

alle dort gefundenen Resonanzen auch hier auftraten und zudem 3-5 zusätzliche Signale sichtbar wurden (vgl. Abb. 3.26, Seite 76). Diese gehören dementsprechend zu den neu auftretenden Basenpaarungen, die durch die beidseitige Verlängerung des RNA-Stammes um jeweils 3 Nukleotide entstehen. Dass die Anzahl dieser zusätzlichen Signale durchaus größer als drei sein kann, ist durch das Fehlen der Signale von Guanin-1 und Uracil-24 bei der kürzeren RNA-Variante erklärbar. In Folge der Verlängerung könnten die Imino-Signale dieser beiden Basen möglicherweise durch eine Stabilisierung des RNA-Stammes sichtbar werden, so dass theoretisch insgesamt fünf zusätzliche Signale denkbar sind.

Somit standen alle Bindungspartner für die strukturelle Untersuchung des Antiterminationskomplexes von EIAV zur Verfügung: verschiedene Varianten von Cyclin T1, EIAV-Tat-Protein und TAR-RNA.

4.3 Strukturelle Untersuchung einzelner Bindungspartner

Eine erste strukturelle Charakterisierung der einzelnen Bindungspartner mit CD- und NMR-Spektroskopie erbrachte Daten über Sekundärstrukturelemente und mögliche Faltungen der Proteine und Peptide bzw. der RNA.

4.3.1 Hinweise auf α -helicale Strukturelemente bei hCycT1_V29L

Bisher liegen kaum strukturelle Daten über Cyclin T1-Proteine vor. Der Vergleich mit anderen Cyclinen wie z. B. dem Cyclin H lässt jedoch erwarten, dass Cyclin T1 hauptsächlich α -helical ist (Taube et al., 2000). Da erste Untersuchungen an rekombinantem hCycT1 bereits gezeigt hatten, dass dieses tatsächlich α -helicale Strukturelemente besitzt (unveröffentlichte Ergebnisse), sollte es im Falle von hCycT1_V29L nicht anders sein, da nur eine Aminosäure ausgetauscht wurde.

Tatsächlich deuten die Ergebnisse der CD- und NMR-spektroskopischen Untersuchungen darauf hin, dass auch hCycT1_V29L α -helical ist. Das CD-Spektrum (vgl. Abb. 3.8, Seite 55) weist die typischen Minima bei 208 und 222 nm auf.

Diese Ergebnisse führten zur Vermutung, dass das rekombinante hCycT1_V29L strukturiert vorlag, zumal Signale hochfeld von 0,8 ppm sichtbar sind, was auf tertiäre Kontakte hindeutet. Ein Spektrum eines relativ unstrukturierten Proteins würde solche Signale nicht aufweisen, wie es z. B. bei EIAV-Tat (Willbold, 1993) und auch Mini_eCyc_45 (vgl. Abb. 3.11, Seite 59) beobachtet werden kann.

Das rekombinante hCycT1_V29L lag also strukturiert und mit hauptsächlich α -helicalen Strukturelementen vor.

Die vom Cyclin T1 abgeleiteten Mini-Cycline sind unstrukturiert

Auch eine erste strukturelle Charakterisierung der Mini-Cycline wurde mit 1D-NMR- und mit CD-Messungen durchgeführt. Das 2D-TOCSY-Spektrum (vgl. Abb. 3.11 C, Seite 59) von Mini_eCyc_45 besaß – wahrscheinlich aufgrund der schlecht ausgeprägten Struktur des Peptids – nur wenige Signale. Eine Auswertung dieser Spektren war nicht möglich.

So zeigten auch die 1D-NMR-Spektren und die CD-Spektren beider Mini-Cycline, dass sie offensichtlich unstrukturiert vorliegen (vgl. Abb. 3.11 A, Seite 59 und Abb. 3.18, Seite 66). Die NMR-Spektren fallen hochfeld von 1 ppm steil ab, tertiäre Kontakte, die zu Signalen unterhalb von 0,5 ppm führen würden, sind scheinbar nicht ausgeprägt.

Die verkürzten Cycline besitzen also im Gegensatz zu hCycT1_V29L (vgl. Abb. 3.9, Seite 56) keine ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur.

4.3.2 Zuordnung von EIAV-Tat durch die Auswertung von 3D-NMR-Spektren

Die Möglichkeiten der direkten Beobachtung einer Komplexbildung waren bei TAR-RNA und den Cyclinen eher gering, da 1D-Spektren in diesem Fall – abgesehen vom Imino-Bereich der RNA – wenig aussagekräftig sind. Besteht allerdings die Möglichkeit, eine zweite oder dritte Dimension hinzu zu ziehen, wächst der Informationsgehalt der Spektren stark an.

Die Reinigung von EIAV-Tat war bereits sowohl unmarkiert als auch einfach (^{15}N) oder doppelt (^{15}N und ^{13}C) markiert im Labor etabliert (Willbold, 1993; Rosin-Arbesfeld et al., 1994), so dass es naheliegend war, die Auswirkungen einer Komplexbildung vor allem auf Tat-Ebene zu untersuchen. Dafür war es aber erforderlich, eine Zuordnung der Resonanzen im ^{15}N - ^1H -HSQC zu besitzen. Durch die Auswertung von Tripleresonanz-Experimenten konnte diese Zuordnung erstellt werden (vgl. Kap. 3.4).

Die Betrachtung von ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren sollte sich im Verlauf der Experimente als Vorteil erweisen. Denn in nahezu allen Versuchen der Komplexbildung – sei es mit TAR-RNA, Cyclin T1 oder gar bei der Beobachtung von ternären Interaktionen mit beiden Partnern – war die Konzentration dieser Partner mit ca. 100 μM sehr gering, so dass bei einem 1:1-Verhältnis HSQC-Experimente aufgrund des Signal-Rausch-Verhältnisses noch zu auswertbaren Spektren führten. Eine Konzentration von 400 μM , wie sie beispielsweise für die Tripleresonanz-Experimente mindestens nötig gewesen war, konnte im Komplex bisher nicht erreicht werden.

Außerdem lassen sich an HSQC-Spektren direkt die beteiligten Aminosäuren erkennen, ohne dass man aufwendige Mutationsstudien oder komplette Strukturberechnungen durchführen muss.

Bei Zugabe von Na-Dithionit verschwinden die Aminosäuren-Signale der Core-Domäne und des argininreichen Motivs von EIAV-Tat

Da die meisten Experimente unter reduzierenden Bedingungen stattfinden würden, war es sinnvoll die Unterschiede von oxidiertem und reduziertem Tat-Protein im HSQC zu untersuchen. Die Zugabe von Na-Dithionit als Reduktionsmittel hatte tatsächlich Auswirkungen: Die Resonanzen der Aminosäuren Glutamin-38, Leucin-39, Cystein-40, Leucin-42, Serin-44 bis Leucin-50, Alanin-52, Serin-53, Leucin-54, und Alanin-64 verschwanden vollständig (vgl. Abb. 3.25, Seite 74). Zusätzlich wurden die Signale von Phenylalanin-41, Arginin-55, Lysin-56, Lysin-57, Leucin-62 und Lysin-63 schwächer. Alle anderen Signale blieben unverändert.

Die betroffenen Aminosäuren befinden sich in der Core-Region und im argininreichen Motiv, wobei nur die Signale der Aminosäuren aus der Core-Region vollständig verschwanden.

Dass sich im Bereich um die Cysteine 37 und 40 bei einer Reduktion Veränderungen ergeben würden, war vorauszusehen. Gerade in diesem Abschnitt des Proteins tauchen immer wieder Verschiebungen der Signale oder auch mehrere Resonanzen für eine Aminosäure vor allem von Glutamin-38 und Leucin-39 auf, bzw. die Signale einiger Aminosäuren verschwinden teilweise aufgrund von konformationeller Heterogenität des EIAV-Tat durch Disulfid-Brückenbildung. So konnten beispielsweise für die Aminosäuren Tyrosin-35, Histidin-36 und Cystein-37 gar keine Signale zugeordnet werden (vgl. Kap. 3.4).

Dass aber auch die Core-Region und darüber hinaus weitere Aminosäuren von der Zugabe des Reduktionsmittels betroffen sind, könnte an weiteren inter- oder intramolekularen Wechselwirkungen liegen, die möglicherweise über Leucine ausgebildet werden (Taube et al., 2000). Dabei wäre natürlich die Region des ARM weniger betroffen, so dass hier auch geringere Veränderungen auftreten würden. Möglicherweise verschwinden deshalb diese Resonanzen nicht vollständig, sondern werden nur schwächer.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Reduktion zwar zum Verschwinden einiger Signale führt, sonst aber keine Unterschiede zu oxidiertem Tat zu erkennen sind. Deshalb wurden die TOCSY-HSQC-, NOESY-HSQC- und Tripleresonanz-Experimente mit oxidiertem EIAV-Tat durchgeführt, was zum einen den Vorteil hatte, dass möglichst viele Resonanzen zugeordnet werden konnten, und zum anderen sollte sich bei den Komplexbildungs-Versuchen

herausstellen, dass gerade diese Signale wieder auftauchen und zwar verschoben (vgl. Kap. 3.5.1.1, 3.5.1.2 und 3.5.1.5). Bei einer Zuordnung an reduziertem EIAV-Tat hätten demnach wesentliche Teile des Proteins gefehlt, die offensichtlich für die Bindung sowohl an TAR-RNA und TF53 als auch an Cyclin T1 wichtig sind (vgl. Abb. 3.30, Seite 80; Abb. 3.31, Seite 82 und Abb. 3.36, Seite 87).

Das Verschwinden der Resonanzen um die postulierte RNA-Bindungsstelle von EIAV-Tat lässt vermuten, dass durch die Reduktion Veränderungen struktureller Art stattfinden, die sich auf eine etwaige Bindung an z. B. TAR-RNA auswirken müssten. Interessanterweise sind von der Reduktion die gleichen Aminosäuren betroffen, die zur Ausbildung von α -Helices neigen und dadurch die RNA-Bindestelle ausbilden und stabilisieren (Sticht et al., 1993, 1994 und Mujeeb et al., 1994). Tatsächlich ist es in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gelungen, eine direkte Bindung von EIAV-Tat an TAR-RNA zu untersuchen. Dass dabei gerade ein reduzierende Umgebung wichtig ist, zeigen auch die Ergebnisse der Tat/TF53-Bindung, die unter oxidativen Bedingungen nicht beobachtet werden konnte; nur reduziertes EIAV-Tat bindet an TF53 (vgl. Kap. 3.5.1.5).

Die vollständige Zuordnung von EIAV-Tat gelingt durch die Auswertung von Tripleresonanz-Experimenten

Eine Möglichkeit, ^1H -NMR-Resonanzen von EIAV-Tat zuzuordnen, war die Auswertung von TOCSY-HSQC- und NOESY-HSQC-Spektren. Dabei waren jedoch viele Signale aufgrund fehlender TOCSY- oder NOESY-Kreuzsignale nicht zuzuordnen. Es konnten so nur 22 Aminosäuren bestimmt werden (vgl. Abb. 3.21, Seite 70), was aber für genaue Untersuchungen an Komplexen nicht ausreichend gewesen wäre. Erst die Auswertung von Tripleresonanz-Spektren führte schließlich zur Zuordnung von 62 der insgesamt 70 möglichen Aminosäuren im ^{15}N - ^1H -HSQC (vgl. Abb. 3.24, Seite 73). Für die fehlenden acht Reste treten im HSQC keine Signale auf, was wahrscheinlich an der besonders großen Flexibilität gewisser Bereiche liegt. So konnten keine Resonanzen für die ersten vier Aminosäuren sowie für die bereits genannten Positionen 35, 36 und 37 gefunden werden. Dass für den Aminoterminus keine klar definierten Peaks auftreten, liegt wahrscheinlich an dessen Flexibilität. Aus den o. g. Gründen der Beeinflussung durch die benachbarten Cysteine sind auch die Reste 35-40 selten im HSQC zu erkennen. Außer diesen sieben Aminosäuren blieben nur Aspartat-51 und Glutamin-60 ohne Zuordnung. Von letzterem wird vermutet, dass es an der TAR-Bindung beteiligt ist (Derse & Newbold, 1993), was aber in den hier durchgeführten Versuchen mangels Zuordnung nicht überprüfbar war.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Durchführung von Tripleresonanz-Experimenten trotz der höheren Kosten für die Herstellung von doppelt markierten Proben lohnt, wenn das Ziel eine möglichst komplette Zuordnung aller Aminosäuren ist. Außerdem musste für die Bestimmung der 62 Reste sehr viel weniger Zeit aufgewendet werden als für die Zuordnung der 22 Aminosäuren der einfach markierten Probe.

4.4 Wechselwirkungen von EIAV-Tat mit TAR-RNA, TF53 und Cyclin T1

Bisherige Untersuchungen an den Antiterminationskomplexen von HIV und EIAV beruhen häufig auf Gelretardations-Experimenten (Kwak et al., 1999; Wimmer et al., 1999; Garber et al., 2000), oder es wurden strukturelle Charakterisierungen der einzelnen Bindungspartner mittels NMR durchgeführt (Gait & Karn, 1993; Willbold et al., 1994; Aboul-ela et al., 1995, 1996; Bayer et al., 1995). Viele Hinweise auf mögliche Bindungsstellen konnten auch durch Mutationsstudien erbracht werden (Delling et al., 1991; Derse & Newbold, 1993). Strukturelle Untersuchungen an Komplexen sind jedoch bisher nur selten durchgeführt worden (Aboul-ela et al., 1996; Metzger et al., 1997).

Die Ähnlichkeit von EIAV-Tat mit HIV-Tat lässt vermuten, dass beide Proteine über ähnliche Sequenz-Bereiche an TAR-RNA binden. Die Unterschiede der beiden TAR-RNA-Elemente von EIAV und HIV lassen jedoch unterschiedliche Bindungsstellen auf RNA-Ebene erwarten (vgl. Kap. 1.3.1.2). Fraglich war zudem, ob EIAV-Tat überhaupt *in vitro* ohne Cyclin T1 spezifisch an TAR-RNA bindet, denn dafür konnten bisher keine eindeutigen Beweise vorgelegt werden. So wurde ein solcher binärer Komplex zwar von Willbold (1993) postuliert, Gelshift-Experimente konnten die These aber nicht untermauern (Willbold et al., 1998), sondern belegten lediglich eine DNA-Bindung von EIAV-Tat.

Auch die bereits erwähnte Homologie zwischen den verschiedenen CyclinT1-Proteinen legte zunächst den Schluss nahe, dass beide ähnliche Bindungseigenschaften besitzen, was aber schon aufgrund der fehlenden Cysteine im EIAV-Tat-Protein fraglich war, denn während HIV-Tat wahrscheinlich über Cysteine und Zink an hCyclin T1 bindet (Garber et al., 1998; Fujinaga et al., 1999), wird für EIAV-Tat ein Komplex mit eCyclin T1 über Leucin-Brücken diskutiert (Taube et al., 2000). So konnte für beide Komplexpartner die Wichtigkeit von Leucin-Resten für die Transaktivierungs-Aktivität beschrieben werden (für EIAV-Tat: Derse & Newbold, 1993; für eCyclin T1: Taube et al., 2000).

Da die Hemmung von HIV-Tat bzw. dessen Bindung an TAR-RNA als wichtiger Ansatzpunkt bei der Bekämpfung von AIDS angesehen wird (Daelemans et al., 2000; 2001), war es interessant zu untersuchen, ob der spezifische HIV-Tat/TAR-Inhibitor TF53 (früher:

CGA137053; Hamy et al., 2000) auch an EIAV-Tat bindet und ob dadurch ebenso die Bindung an TAR-RNA gehemmt werden kann, so dass es nicht mehr zu einer Ausbildung des für die Virusreplikation wichtigen Antiterminationskomplexes kommen könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein *in vitro*-Komplex zwischen EIAV-Tat und TAR bei pH 6,4 beobachtet werden kann, auch wenn keine weiteren Bindungspartner des Gesamtkomplexes vorhanden sind (vgl. Kap. 3.5.1.1). So bestand zum ersten Mal die Möglichkeit mit Hilfe der bereits geleisteten Zuordnungen von Resonanzen der TAR-RNA (Hoffman & White, 1995) und des Tat-Proteins (diese Arbeit) in den 1D- bzw. HSQC-Spektren die beteiligten Basen respektive Aminosäuren zu ermitteln.

Die Bindung von EIAV-Tat an TAR erfolgt im Loop-Bereich der RNA

Die Bindung von Tat an TAR äußert sich nur in geringfügigen Veränderungen im Imino-Protonen-Signalebereich (vgl. Abb. 3.27, Seite 77). Hauptsächlich die nicht zugeordneten Resonanzen, die zu den am Fuß des RNA-Stammes gelegenen Basenpaaren gehören, sind um bis zu 0,05 ppm verschoben. Etwas kleinere Verschiebungen waren bei Uracil-5, Uracil-18, Guanin-17 und Guanin-21 aufgetaucht. Bei näherer Betrachtung des Spektrums erscheinen fast alle Signale leicht verschoben zu sein, allerdings in verschiedene Richtungen. D. h., es handelt sich wahrscheinlich nicht um eine unspezifische Reaktion wie z. B. einen pH- oder Temperatur-Shift oder eine Reaktion auf das Na-Dithionit, das in der Tat-Lösung enthalten war.

Das Spektrum aus Abb. 3.28 unterstreicht die Hypothese, dass es sich um eine Beeinflussung der TAR-RNA aufgrund einer Bindung an EIAV-Tat handeln muss. Denn bei Inkubation von TAR-RNA mit Reduktionsmittel konnten keine Verschiebungen im Spektrum der Imino-Resonanzen beobachtet werden, wenn auch die Signalintensität nach über 8 h Inkubationszeit etwas schwächer wurde (vgl. Abb. 3.28, Seite 78). Die Basenpaare sind offensichtlich so stabil, dass die Veränderungen bei Tat-Zugabe nur durch eine Bindung und einer damit einhergehenden strukturellen Veränderung der RNA erklärt werden können. Diese Bindung hat aber nur geringe Auswirkungen auf die Imino-Signale, weil EIAV-Tat sehr wahrscheinlich im Loop-Bereich bindet (Carvalho & Derse, 1991; Taube et al., 2000; vgl. Kap. 1.3). Der *Bulge* ist mit nur einem einzelnen ungepaarten Cytosin im Gegensatz zum HIV-RNA-*Bulge*, der in die HIV-Tat-Bindung involviert ist (Hamy et al., 1993; Metzger et al. 1997), schwach ausgeprägt, so dass er wahrscheinlich nicht an einer Bindung beteiligt ist (vgl. Kap. 1.3.1.2). Abgesehen von diesen Ergebnissen belegt die Auswertung der HSQC-Spektren von Tat eindeutig, dass eine Bindung stattfindet.

Die Aminosäuren des Core und des ARM von EIAV-Tat sind von der Bindung an TAR-RNA und den Inhibitor TF53 betroffen

Waren die Auswirkungen der Komplexbildung auf RNA-Ebene nur schwer zu erkennen, so konnten sie im ^{15}N - ^1H -HSQC von EIAV-Tat umso besser untersucht werden. Hier wurden deutliche Veränderungen beobachtet, die sich zum großen Teil auf die bei Reduktion verschwundenen Signale bezogen (vgl. Abb. 3.30, Seite 80). Von den Aminosäuren des Core-Bereiches (Tyrosin-35 bis Tyrosin-49) waren Leucin-39, Cystein-40, Phenylalanin-41, Serin-44, Glycin-46 und Isoleucin-47 betroffen. Ob auch die Signale von Leucin-42, Arginin-43 und Leucin-45 betroffen sind, konnte nicht abschließend geklärt werden. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den schon 1993 durchgeführten Versuchen von Churcher et al. (1993), bei denen die Bedeutung der Core-Region für die RNA-Erkennung beschrieben wurde. Der Linkerbereich zwischen Core- und ARM-Region – bestehend aus den Aminosäuren Leucin-50 bis Leucin-54 – unterliegt ebenfalls ausgeprägten Veränderungen, genauso wie die Reste des ARM (Arginin-55 bis Arginin-61) selbst. Beteiligt sind hier Arginin-55, Lysin-56 und Asparagin-58. Die Signale von Lysin-57, Lysin-59 und Arginin-61 befinden sich in einem Bereich, in dem zwar weitere Veränderungen auftreten, der sich aber durch eine geringe Dispersion auszeichnet (vgl. Abb. 3.24, Seite 73), so dass auch hier keine detaillierten Aussagen getroffen werden können. Es kann allerdings anhand dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass die basischen Aminosäuren zwischen Arginin-55 und Arginin-61 wesentlich an der TAR-RNA-Bindung beteiligt sind. Dies konnten auch schon Derse & Newbold (1993) anhand von Mutationsstudien für Asparagin-58 und Lysin-59 belegen. N58R- und K59R-Mutanten verloren einen großen Teil ihrer RNA-Bindungsaffinität, obwohl die jeweiligen Aminosäuren durch Arginine ersetzt worden waren. Dagegen hatten Mutationen in der Linkerregion unterschiedliche Effekte. Während sich eine S53A-Mutation kaum auswirkte war eine L54R-Mutante fast völlig inaktiv. Diese Ergebnisse decken sich mit den hier ermittelten: Das Signal von Serin-53 verändert sich nur bei Zugabe von Cyclin T1, Leucin-54 dagegen auch bei TAR-Bindung.

Neuere Erkenntnisse aus Versuchen mit Phagendisplay von HIV-Tat deuten darauf hin, dass die Anwesenheit von Argininen im ARM von HIV-Tat für eine Bindung an HIV-TAR nicht unbedingt notwendig ist (Hoffmann & Willbold, 1997; Hoffmann, 1998; Jonas, 2002). Auch für EIAV-Tat kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Arginine an den Positionen 55 und 61 nicht essentiell sind. Schließlich ist im Gegensatz zum HIV-Tat das argininreiche Motiv mit nur zwei Argininen aber vier Lysinen eher eine lysinreiche Region. Allein schon die

Verringerung der Anzahl an Argininen im Vergleich zu andern Tat-Proteinen lässt vermuten, dass sie auch im EIAV-System keine entscheidende Rolle bei der Bindung an TAR-RNA übernehmen. Entscheidend scheint nur zu sein, dass mindestens sechs basische Reste in der TAR-Binderegion vorhanden sind (Delling et al., 1991). Dennoch sind gerade diese beiden Arginine in HIV- und EIAV-Tat konserviert. Möglicherweise haben ihre positiv geladenen Seitenketten eine wichtige Funktion bei der Erkennung von TAR-RNA (Katsamba et al., 2001).

Die Bedingungen für die Bildung eines Komplexes zweier Bindungspartner war im Falle der Tat/TAR-Bindung leicht herzustellen, da nur zwei reine Komponenten gemischt werden mussten. Der Inhibitor TF53 stand aber nur als 10%ige Lösung zur Verfügung. Die hemmende Wirkung von dieser unreinen Probe konnte zwar im HIV-System kürzlich mittels Gelshifts nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Dr. B. Wöhr), eine direkte Vermischung der TF53-Lösung mit EIAV-Tat scheiterte primär an der Präzipitation des Proteins (vgl. Kap. 3.5.1.5). Demnach musste eine andere Vorgehensweise gewählt werden, beide Komponenten zusammen zu bringen und gleichzeitig Verunreinigungen der NMR-Probe zu vermeiden.

Die Dialyse gegen einen Puffer, der TF53 in geringer Konzentration enthielt, stellte sich als gute Möglichkeit heraus, dieses Ziel zu erreichen (vgl. Kap. 3.5.1.5). Durch einen zweiten Dialyseschritt gegen NMR-Puffer ohne TF53 sollten alle nicht gebundenen Verunreinigungen auf jeden Fall wieder entfernt worden sein. Allerdings bestand die Gefahr, dass sich ein schlecht gebundener Inhibitor während dieser zweiten Dialyse zu schnell löst und schließlich entfernt wird. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass EIAV-Tat nach der Prozedur ligandengebunden vorlag, was durch Verschiebungen im ^{15}N -HSQC belegt wurde (vgl. Abb. 3.36, Seite 87). Diese Bindung musste stark sein, da die Konzentration des Inhibitors im umgebenden Puffer sehr gering war. Würde es sich nur um eine unspezifische Reaktion handeln, wäre es durch die Dialyse nicht möglich gewesen, ausreichend Inhibitor oder eine andere Substanz durch die Membran zu schleusen, um an das 100-fach konzentrierte Tat-Protein zu binden und damit die beobachteten Verschiebungen zu verursachen. Dass TF53 hoch spezifisch an HIV-Tat bindet und sogar TAR-RNA verdrängt, konnten schon Hamy et al. (2000) zeigen.

Der Inhibitor geht aber auch – wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen – mit EIAV-Tat Wechselwirkungen ein. Diese sind derart, dass nahezu die gleichen Aminosäuren wie bei der TAR-Bindung betroffen sind (vgl. Abb. 3.37, Seite 88). Das heißt, das Tat-Protein bindet offensichtlich in ähnlicher Weise an den Inhibitor TF53 wie an die TAR-RNA, was zu den

beobachteten Verschiebungen führt, die entweder direkt durch die Bindung des Inhibitors oder indirekt durch eine strukturelle Veränderung des Proteins hervorgerufen werden. Beides würde in jedem Fall die RNA-Binderegion betreffen, so dass die TAR nicht mehr an Tat binden könnte. Eine detaillierte Untersuchung wird aber erst durch den Einsatz von reinem TF53 möglich sein, da die TAR-RNA während der aufwendigen Dialyse-Prozedur durch die Verunreinigungen der hier eingesetzten TF53-Lösung Schaden nehmen würde.

Trotz der Ähnlichkeiten sind einige Unterschiede zu beobachten: Die Bindung an TF53 wirkt sich nicht auf Arginin-55 und Asparagin-58 aus, deren Resonanzen bei der TAR-Bindung starken Veränderungen unterlegen waren. Dagegen wurden stärkere Verschiebungen bei den Leucinen beobachtet. Die Region der Wechselwirkung ist also bei beiden Bindungspartnern von EIAV-Tat gleich; die beteiligten Aminosäuren sind aber teilweise verschieden.

Die Leucine- 74 und 75 von EIAV-Tat zeigen Wechselwirkungen mit hCycT1_V29L

Schon seit den Untersuchungen von Derse und Newbold sowie der Mitarbeiter um B. M. Peterlin wird eine Beteiligung von Leucinen an der EIAV-Tat/eCyclinT1-Bindung postuliert. Zum einen konnte gezeigt werden, dass carboxyterminale Aminosäuren des Tat-Proteins (Noiman et al., 1991; Carroll et al., 1991; 1992) – vor allem aber die Leucine- 74 und 75 (Derse & Newbold, 1993) – wichtig für dessen Transaktivierungsaktivität sind. Andererseits ist erwiesen, dass das Leucin-29 von eCyclin T1 maßgeblich an der Tat-Bindung beteiligt sein muss, da eine V29L-Mutante des humanen Cyclin T1 ebenfalls an EIAV-Tat bindet und dies für eine L29V-Mutante von eCyclin T1 nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Taubé et al., 2000).

Somit sollte das in dieser Arbeit gereinigte hCycT1_V29L ein potentieller Bindungspartner für EIAV-Tat sein und möglicherweise Wechselwirkungen mit den Leucinen von Tat eingehen können. Die Ergebnisse zeigen, dass tatsächlich mehrere Leucinen von der Zugabe des Cyclins betroffen sind (vgl. Abb. 3.31, Seite 82). Diese Veränderungen sind erstmals auch bei den carboxyterminalen Leucinen- 74 und 75 zu erkennen, die bei der Zugabe von TAR-RNA oder TF53 nicht verschoben waren. Die Leucine der Core-Region (42 und 45) sowie des Linkers zwischen Core und ARM (50 und 54) sind möglicherweise auch betroffen, obwohl die Veränderungen nicht eindeutig zugeordnet werden können, da die jeweiligen Resonanzen im Zuge der Reduktion verschwinden und nur teilweise nach Bindung an hCycT1_V29L wieder auftauchen. Da auch Alanin-52 und Serin-53 Veränderungen unterliegen aber weder Arginin-43 noch Serin-44, ist es wahrscheinlich, dass die benachbarten Leucine- 50 und 54 mit Cyclin wechselwirken, zumal der Bereich von Serin-44 bis Isoleucin-47 eine Unterbrechung des

helikalen Interaktionsbereiches durch einen TypII-Turn darstellt (Sticht et al., 1993; 1994). Auch Taube et al. (2000) gehen davon aus, dass die Leucine- 50 und 54 mit den Resten 74 und 75 eine Leucin-Brücke bilden, die erst durch eine Bindung an eCyclin T1 aufbricht, wodurch strukturelle Veränderungen des Tat-Proteins hervorgerufen werden. Die Öffnung der Leucin-Brücke durch die Interaktion mit dem Leucin-29 von hCycT1_V29L würde somit das RNA-Bindungsmotiv freigeben. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, bindet EIAV-Tat auch ohne Cyclin an die TAR-RNA, so dass das RNA-Bindungsmotiv von EIAV-Tat mit den Resten Arginin-55 bis Arginin-61 bereits zugänglich war. Die Wechselwirkung der Leucine ist deshalb zwar vorhanden, hat aber weniger strukturelle Auswirkungen. So sind die beobachteten Verschiebungen nur sehr gering, was allerdings auch durch die niedrige Konzentration von hCycT1_V29L bedingt sein kann (vgl. Kap. 3.5.1.2).

Deutliche Hinweise auf die Beteiligung der Leucine geben auch die Wechselwirkungen, die bei der ternären Interaktion von Tat, TAR und Mini_eCyc_45 beobachtet werden konnten (vgl. Abb. 3.39, Seite 91). Obwohl deren Resonanzen bei der TAR-Bindung verschoben aufgetreten waren, verschwanden sie wieder – neben anderen Aminosäuren der direkten Nachbarschaft – bei der Zugabe von Mini_eCyc_45.

Zusammenfassend kann also von einer Beteiligung mehrerer Leucine an der Tat/CyclinT1-Interaktion ausgegangen werden.

Die Zugabe von Mini_eCyc_45 und Mini_eCyc_75 bewirkt nur geringe Veränderungen von EIAV-Tat

Wichtig war zudem die Frage, ob auch die verkürzten Cycline mit Tat interagieren würden. Die Ergebnisse zeigen, dass es – bis auf die Aufspaltung der beiden Tryptophan-Resonanzen zu drei Signalen (vgl. Abb. 3.40, Seite 92) – keine Wechselwirkungen zwischen EIAV-Tat und Mini_eCyc_45 zu geben scheint (vgl. Abb. 3.33, Seite 84), während die Zugabe von Mini_eCyc_75 einige wenige Veränderungen im HSQC von EIAV-Tat bewirkt (vgl. Abb. 3.35, Seite 85). Die Verschiebungen sind jedoch sehr klein und können nicht bestimmten Aminosäuren zugeordnet werden. Ansatzweise lassen sich Wechselwirkungen nur bei Isoleucin-47 und Isoleucin-65 beobachten, sowie bei drei Seitenketten-Resonanzen der Glutamine bzw. Asparagine. Genauso schwierig einzuordnen waren die neu auftretenden Signale im 1D-NMR-Spektrum von Mini_eCyc_75 (vgl. Abb. 3.34, Seite 85). Definitive Aussagen über eine Bindung an EIAV-Tat lassen sich daraus nicht herleiten, da diese Signale auch durch einen Abbau von Mini_eCyc_75 zustande kommen könnten. Dennoch lässt sich in Kombination mit den HSQC-Daten vermuten, dass eine Interaktion stattfindet.

Da sowohl EIAV-Tat (Willbold et al., 1994) als auch Mini_eCyc_45/75 (vgl. Abb. 3.11, Seite 59 und Abb. 3.18, Seite 66) Proteine bzw. Peptide ohne ausgeprägte Sekundärstruktur sind, ist davon auszugehen, dass die für die Bindung wichtigen α -helikalen Bereiche erst durch die Interaktion mit dem Bindungspartner stabilisiert werden (Sticht et al., 1994; Willbold et al., 1996). Die hier verwendeten verkürzten Cycline sind möglicherweise noch zu kurz, um diese Stabilisierung zu gewährleisten, denn schon das 75 Reste lange Protein scheint mehr Veränderungen zu bewirken als das um 30 Aminosäuren kürzere Peptid.

Wechselwirkungen von Mini_eCyc_45 mit EIAV-Tat konnten erst in Anwesenheit der TAR-RNA beobachtet werden.

Verstärkung der beobachteten Wechselwirkungen durch ternäre Interaktionen zwischen EIAV-Tat, TAR-RNA und Mini_eCyc_45

Die HSQC-Resonanzen von Tat zeigten keine Verschiebungen unter dem Einfluss von Mini_eCyc_45 (s.o.). Wurden alle drei potentiellen Bindungspartner jedoch vermischt, konnten sowohl bei den RNA-Signalen als auch auf Protein-Ebene Veränderungen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.38, Seite 90 und Abb. 3.39, Seite 91).

Schon 1998 konnten Mitarbeiter von K. Jones zeigen, dass Cyclin T1 für die spezifische TAR-Bindung des HIV-Tat-Proteins von großer Bedeutung ist (Wei et al., 1998). Kürzlich konnte auch bewiesen werden, dass TAR-RNA die Bindungsaffinität von HIV-Tat und hCyclin T1 erhöht (Zhang et al., 2000).

Im ^{15}N - ^1H -HSQC von EIAV-Tat sind bei der Zugabe von TAR-RNA und Mini_eCyc_45 Wechselwirkungen zu beobachten (vgl. Abb. 3.39, Seite 91). Dabei ist auffällig, dass mit Ausnahme von Leucin-39 und Isoleucin-47 die gleichen Veränderungen wie bei der TAR-Bindung zu sehen sind, insgesamt zehn dieser Verschiebungen aber ganz verschwinden. Im Bereich zwischen Cystein-40 und Isoleucin-65 sind hierbei vor allem die Resonanzen der Leucine- 42, 45, 54 und 62 sowie der direkt an diese angrenzenden Aminosäuren betroffen. Die ^1H -Signale der Tryptophane von Mini_eCyc_45 zeigen ebenfalls Unterschiede zur Tat-gebundenen Form auf, was auf eine strukturelle Veränderung des Cyclins zurückgeführt werden kann. Offensichtlich wird durch die Anwesenheit der TAR-RNA eine Interaktion von Mini_eCyc_45 und EIAV-Tat stabilisiert, was im Einklang mit den im HIV-System untersuchten Mechanismen der gegenseitigen Verstärkung steht (Zhang et al., 2000).

Die bereits diskutierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Imino-Signale der TAR-RNA sich bei der Zugabe von EIAV-Tat nur wenig veränderten (s.o.).

Bei einer Zugabe von Tat und Mini_eCyc_45 werden allerdings die meisten Imino-Signale wesentlich schwächer (vgl. Abb. 3.38 A, Seite 90), was aber weniger bei den artifiziellen Resonanzen zu erkennen ist. Wahrscheinlich findet eine strukturelle Veränderung der TAR-RNA statt, die zum Aufbrechen einzelner Wasserstoffbrücken führt, ohne dass die Basen direkt an einer Bindung beteiligt sein müssen. Denkbar wäre auch eine erhöhte Dynamik des RNA-Moleküls, die durch eine Bindung hervorgerufen sein könnte und zum Verschwinden einzelner Resonanzen führen würde. Häufig sind schwächer werdende Signale auch durch einen Abbau oder durch eine pH-Veränderung verursacht. Da aber einige Resonanzen nicht schwächer werden und zudem die Signalintensität im Bereich des restlichen Spektrums nahezu gleich bleibt (vgl. Abb. 3.38 B, Seite 90), kann ein Abbau der RNA ausgeschlossen werden. Der pH wurde grundsätzlich vor jedem Experiment und nach der Zugabe der einzelnen Bindungspartner überprüft. Dabei waren keine Veränderungen zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass alle Versuche bei pH 6,4 stattgefunden haben.

Die insgesamt starken Veränderungen könnten natürlich auch durch eine Teilnahme des RNA-Stammes an der Bindung von Tat und Cyclin zustande kommen. Weil sich aber bei gleichbleibendem pH keine Verschiebungen zeigen, sondern nur eine Abschwächung der Signale auftritt, scheint eine strukturelle Veränderung aufgrund einer Wechselwirkung mit dem Loop wahrscheinlicher zu sein.

4.5 Ausblick

Die optimierte Reinigung von hCyclinT1_V29L ermöglicht eine Markierung des Proteins mit Isotopen, so dass in Zukunft die strukturelle Untersuchung bis hin zu einer 3D-Struktur in Lösung mit empfindlicheren Messmethoden, wie bspw. durch den Einsatz eines Kryoprobekopfes, möglich sein sollte.

Die Mini-Cycline bieten bei der Untersuchung von ternären Wechselwirkungen zwischen Tat, TAR und Cyclin T1 eine interessante Alternative zum Cyclin T1 (272Δ). Die Optimierung der Mini_eCyc_75-Reinigung sollte auch für diese Variante eine Isotopenmarkierung möglich machen, die wiederum weitergehende strukturelle Untersuchungen ermöglichen wird. Außerdem ist anhand der hier vorgestellten Ergebnisse zu erwarten, dass Mini_eCyc_75 einfach in der Handhabung ist und möglicherweise stabilere Strukturen ausbildet als Mini_eCyc_45, dessen Wechselwirkungen mit Tat und TAR bereits beobachtet werden konnten.

Durch die in der vorliegenden Arbeit geleistete Zuordnung des Aminosäuren-Rückgrats von EIAV-Tat können Veränderungen der strukturellen Eigenschaften des Proteins – direkt über das ^{15}N - ^1H -HSQC – einzelnen Aminosäuren zugeordnet werden, so dass die Auswertung von Interaktionen mit potentiellen Bindungspartnern wie auch Inhibitoren vereinfacht werden konnte. Damit kann z. B. in Zukunft die direkte Hemmung der Tat/TAR-Bindung durch reines TF53 oder auch durch andere Inhibitoren untersucht werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse legen ebenfalls eine Markierung der TAR nahe, um die Struktur der RNA im Komplex mit EIAV-Tat bzw. mit Tat und Cyclin bestimmen zu können.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden strukturelle Untersuchungen am Antiterminations-komplex von EIAV durchgeführt.

Die Auswertung von Tripleresonanz-NMR-Experimenten ermöglichte die sequentielle Zuordnung der Resonanzen von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem EIAV-Tat. Zum ersten Mal konnten mit Hilfe dieser Zuordnung strukturelle Veränderungen des Proteins bei der Wechselwirkung mit TAR-RNA, Cyclin T1 und dem Inhibitor TF53 auf der Basis einzelner Aminosäuren direkt in einem ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektrum beobachtet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass das EIAV-Tat-Protein ohne die Beteiligung weiterer Bindungspartner an die TAR-RNA bindet. Bei dieser Bindung erfahren die Core-Domäne (Tyrosin-35 bis Tyrosin-49) und das argininreiche Motiv (ARM; Arginin-55 bis Lysin-63) von EIAV-Tat strukturelle Veränderungen, wobei auch der zwischen diesen beiden Domänen liegende Linker (Leucin-50 bis Leucin-54) betroffen ist. Auf RNA-Ebene deutet die Analyse der Imino-Protonen-Verschiebungen auf strukturelle Veränderungen bei der Tat-Wechselwirkung hin, die sich aber auf den Stamm der RNA nur wenig auswirken, so dass von einer Bindung an die ungepaarten Basen der Loopregion ausgegangen werden kann.

Die Untersuchung der Interaktionen von EIAV-Tat mit TF53 – einem Inhibitor der HIV-Tat/TAR-Bindung – ergab, dass dieser auch an das virale Protein aus EIAV bindet und dabei – ähnlich wie die TAR-RNA – strukturelle Veränderungen der Core- und ARM-Region induziert. Die Veränderungen des Tat-Proteins, die bei der TF53-Bindung beobachtet wurden, stimmen mit denen der TAR-Bindung zu einem großen Teil überein; Unterschiede sind nur bei wenigen Resonanzen zu erkennen. Offensichtlich bindet der Inhibitor zwar nicht an alle Aminosäuren, die bei der Wechselwirkung mit TAR-RNA beteiligt sind. Beispielsweise sind die für die TAR-Bindung wichtigen Reste Arginin-55 und Asparagin-58 hier nicht betroffen. TF53 bedingt aber ähnliche strukturelle Veränderungen des Tat-Proteins, so dass die TAR-Bindung gehemmt werden könnte.

Die Wechselwirkungen von EIAV-Tat mit dem Wirtsfaktor Cyclin T1 wurden anhand verschiedener Systeme untersucht. Da die Reinigungen von Pferde-Cyclin T1 (eCycT1) und einer His-*tagged* Form von eCycT1 trotz erfolgreicher Expression beider Proteine in *E. coli* nicht zu einer ausreichend konzentrierten Lösung führten, wurde die Reinigung einer V29L-Mutante von humanem Cyclin T1 (hCycT1_V29L) mittels Ammoniumsulfat-Fällung und einer

hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) etabliert. Das an EIAV-Tat bindende hCycT1_V29L konnte bis zu 80 μM konzentriert werden. Erste CD- und NMR-spektroskopische Untersuchungen belegen, dass sowohl eCycT1 als auch hCycT1_V29L hauptsächlich α -helikale Strukturelemente besitzen.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass hCycT1_V29L Wechselwirkungen mit EIAV-Tat über Leucine eingeht. Dabei sind neben einigen bereits in der TAR-Bindung involvierten Resten der Core- und Linker-Region auch die Leucine-74 und 75 beteiligt.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der 272 Aminosäuren großen CyclinT1-Proteine wurden zudem Untersuchungen mit verkürzten Cyclin-Varianten durchgeführt, die nur die wichtigen amino- und carboxyterminalen Bereiche von Cyclin T1 – verbunden durch einen FKSG-Linker – enthielten. Das daraus abgeleitete synthetische Peptid Mini_eCyc_45 und das etwas längere in *E. coli* überexprimierte und über Heparin-Sepharose gereinigte Mini_eCyc_75 zeigen in CD- und 1D-NMR-Spektren keine reguläre Sekundärstruktur. Beide Mini-Cycline gehen mit EIAV-Tat nur geringe Wechselwirkungen ein, die sich lediglich bei der Interaktion mit Mini_eCyc_75 in wenigen Verschiebungen der Seitenketten-Resonanzen im ^{15}N - ^1H -HSQC beobachten lassen.

Eine Verstärkung der zwischen zwei Bindungspartnern auftretenden Wechselwirkungen wurde bei der Untersuchung von ternären Interaktionen zwischen EIAV-Tat, TAR-RNA und Mini_eCyc_45 beobachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Mini_eCyc_45 zusätzliche strukturelle Veränderungen der TAR-RNA bewirkt. Anhand der Veränderungen im ^{15}N - ^1H -HSQC von EIAV-Tat konnte ebenso gezeigt werden, dass sich – ähnlich wie bei der Bindung von hCycT1_V29L an Tat – wahrscheinlich mehrere Leucine an dieser ternären Interaktion beteiligen.

6 Summary

In the present work structural investigations of the EIAV antitermination complex were carried out.

The analysis of triple resonance NMR experiments led to the sequence assignment of the resonances of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled EIAV Tat. Based on this assignment for the first time structural changes of the protein could be observed directly on the level of single amino acids in a ^{15}N - ^1H -HSQC spectrum when interacting with TAR RNA, cyclin T1 and the inhibitor TF53.

It was possible to show that the EIAV Tat protein binds to the TAR RNA without the involvement of any additional binding partner. This binding leads to structural changes of the core domain (tyrosine-35 to tyrosine-49) and the arginine rich motif (ARM; arginine-55 to lysine-63) of EIAV-Tat, affecting also the linker (leucine-50 to leucine-54) between these two domains. The analysis of the imino proton shifts of the RNA interacting with Tat indicates structural changes which have little effect on the RNA stem region. Therefore, it can be assumed that Tat binds to the unpaired bases of the loop region.

The investigation of the interactions of EIAV Tat with TF53 – an inhibitor of the HIV Tat/TAR binding – showed that TF53 also binds to the viral protein from EIAV and induces structural changes of the core and the ARM region – similar to the TAR-RNA. The structural changes of the Tat protein which were observed upon interaction with TF53 are highly similar to the changes found in TAR binding. Only few resonances show differences, revealing that the inhibitor does not bind to all of the amino acids which are involved in the interaction with TAR RNA. For example, the residues arginine-55 and asparagine-58 which are important for the TAR binding are not affected. But overall TF53 leads to similar structural changes of the Tat protein which could indicate that the TAR binding was inhibited.

The interactions of EIAV-Tat with the host factor cyclin T1 were investigated with the help of different systems. As the purification of equine cyclin T1 (eCycT1) and a His-tagged eCycT1 did not lead to a sufficiently concentrated solution – despite a successful expression of both proteins in *E. coli* – the purification of a V29L-mutant of human cyclin T1 (hCycT1_V29L) was established by precipitation with ammonium sulfate and a hydrophobic interaction chromatography (HIC). The EIAV Tat binding protein hCycT1_V29L was concentrated up to 80 μM . First CD and NMR spectroscopic investigations prove that eCycT1 as well as hCycT1_V29L adopt an overall helical structure.

Apart from that it was shown that hCycT1_V29L interacts with EIAV-Tat using leucines. In this process, some of the residues of the core and linker region which show interactions with TAR RNA are involved as well as leucine-74 and 75.

Because of the bad solubility of the 272 amino acids sized cyclin T1 proteins, shortened cyclin variants including only the important amino and carboxy terminal regions of cyclin T1 linked by an FKSG-linker were investigated additionally. Both, the synthetic peptide Mini_eCyc_45 deduced by this strategy as well as the longer Mini_eCyc_75 which was overexpressed in *E. coli* and purified with heparin sepharose, show no regular secondary structure in CD and 1D-NMR spectra. Both mini cyclins interact only weakly with EIAV-Tat. These interactions are only reflected by very few shifts of the side chain resonances in a ^{15}N - ^1H -HSQC spectrum of Tat bound to Mini_eCyc_75.

An increase in the interactions of two binding partners were observed when investigating ternary interactions between EIAV Tat, TAR RNA and Mini_eCyc_45. It was possible to show that the binding of Mini_eCyc_45 induces additional structural changes. With the help of the changes found in the ^{15}N - ^1H -HSQC spectrum of EIAV Tat it was shown that several leucines are involved in this ternary interaction – similar to the binding of hCycT1_V29L to Tat.

7 Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
AIDS	acquired immunodeficiency virus
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARM	argininreiches Motiv
BIV	Bovine immunodeficiency virus
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAEV	caprine arthritis encephalitis virus
cCycT1	Cyclin T1 aus Hund (canine)
CD	Circulardichroismus
CDK/Cdk	cyclinabhängige Kinase
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CIP	calf intestine phosphatase
COSY	correlated spectroscopy
CTD	carboxyterminale Domäne
CV	Säulenvolumen
CycT	Cyclin T
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	double stranded DNA
DSIF	Dichlor-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazol sensitive inducing factor
DTT	Dithiothreitol
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

eCycT1	Cyclin T1 aus Pferd (equine)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIAV	Equine infectious anemia virus
FIV	Feline immunodeficiency virus
g	Gramm, Erdbeschleunigung
hCycT1	Cyclin T1 aus Mensch (human)
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HIV	human immunodeficiency virus
HSQC	heteronuclear single quantum correlated spectroscopy
IMAC	immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
K	Kelvin oder Lysin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LTR	long terminal repeat
mCycT1	Cyclin T1 aus Maus (murine)
mRNA	Boten-RNA
MVV	Maedi-Visna-Virus
NELF	negative elongation factor
NLS	nuclear localization signal
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCAF	p300/CREB-binding protein-associated factor
PCR	polymerase chain reaction
PDB	Protein-Datenbank
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
ppm	parts per million
P-TEFb	positive transcription elongation factor b
rev	regulator of expression of virion proteins

rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNAPII	RNA-Polymerase II
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIV	Simian immunodeficiency virus
ssRNA	single stranded RNA
$[\theta]_{MRW}$	mittlere residuale Elliptizität
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK	Tat-associated kinase
TAR	tat-responsive element
tat	transactivator of transcription
TBP	TATA-binding-protein
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TF53	Name des HIV-Tat/TAR-Inhibitors
TFE	Trifluorethanol
TOCSY	Total correlated spectroscopy
TPPI	time proportional phase incrementation
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRM	Tat/TAR recognition motif
U	units oder Uracil
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

Aminosäuren sind entweder im Einbuchstaben- oder im Dreibuchstaben-Code abgekürzt.

Nukleotide sind im Einbuchstaben-Code groß oder klein abgekürzt.

8 Literaturverzeichnis

- Aboul ela, F.; Karn, J.; and 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**, 313-332.
- Aboul ela, F.; Karn, J.; and Varani, G.** (1996). Structure of HIV-1 TAR RNA in the absence of ligands reveals a novel conformation of the trinucleotide bulge. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3974-3981.
- Agwale, S. M.; Shata, M. T.; Reitz, Jr., M. S.; Kalyanaraman, V. S.; Gallo, R. C.; Popovic, M.; and Hone, D. M.** (2002). A Tat subunit vaccine confers protective immunity against the immune-modulating activity of the human immunodeficiency virus type-1 Tat protein in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10037-10041.
- Albrecht, T. R.; Lund, L. H.; and Garcia-Blanco, A.** (2000). Canine Cyclin T1 rescues Equine Infectious Anemia Virus Tat *Trans*-Activation in Human Cells. *Virology*, **268**, 7-11.
- Baltimore, D.** (1970). Viral RNA dependent DNA polymerase. *Nature*, **226**, 1209-1211.
- Barboric, M.; Taube, R.; Nekrep, N.; Fujinaga, K.; and Peterlin, B. M.** (2000). Binding of Tat to TAR and Recruitment of Positive Transcription Elongation Factor b Occur Independently in Bovine Immunodeficiency Virus. *J. Virol.*, **74** (13), 6039-6044.
- Barré-Sinoussi, F.; Cherman, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; and Montagnier, L.** (1983). Isolation of an T-lymphotrophic Retrovirus from a Patient at Risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.
- Bayer, P.; Kraft, M.; Ejchart, A.; Westendrop, M.; Frank, R.; and Rösch, P.** (1995). Structural Studies of HIV-1 Tat Protein. *J. Mol. Biol.*, **247**, 529-535.
- Belshan, M.; Park, G. S.; Bilodeau, P.; Stoltzfus, C. M.; and Carpenter, S.** (2000). Binding of Equine Infectious Anemia Virus Rev to an Exon Splicing Enhancer Mediates Alternative Splicing and Nuclear Export of Viral mRNAs. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3550-3557.
- Berkhout, B. & Jeang, K. T.** (1989). trans activation of human immunodeficiency virus type 1 is sequence specific for both the single-stranded bulge and loop of the trans-acting-responsive hairpin: a quantitative analysis. *J. Virol.*, **63**, 5501-5504.

- Berkhout, B. & Jeang, K. T.** (1991). Detailed mutational analysis of TAR RNA: critical spacing between the bulge and loop recognition domains. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6169-6176.
- Berkhout, B.; Silverman, R. H.; and Jeang, K. T.** (1989). Tat transactivates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell*, **59**, 273-282.
- Betti, M.; Voltan, R.; Marchisio, M.; Mantovani, I.; Boarini, C.; Nappi, F.; Ensoli, B.; and Caputo, A.** (2001). Characterization of HIV-1 Tat proteins mutated in the transactivation domain for prophylactic and therapeutic application. *Vaccine*, **19**, 3408-3419.
- Bieniasz, P. D.; Grdina, T. A.; Bogerd, H. P.; and Cullen, B. R.** (1998). Recruitment of a Protein Complex Containing Tat and Cyclin T1 to TAR governs the Species Specificity of HIV-1 Tat. *EMBO J.*, **17**, 7056-7065.
- Bieniasz, P. D.; Grdina, T. A.; Bogerd, H. P.; and Cullen, B. R.** (1999a). Highly Divergent Lentiviral Tat Proteins activate Viral Gene Expression by a Common Mechanism. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4592-4599.
- Bieniasz, P. D.; Grdina, T. A.; Bogerd, H. P.; and Cullen, B. R.** (1999b). Analysis of the Effect of Natural Sequence Variation in Tat and in Cyclin T on the Formation and RNA Binding Properties of Tat-Cyclin T Complexes. *J. Virol.*, **73**, 5777-5786.
- Birnboim, H. C.; & Doly, J.** (1979). A rapid procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Carroll, R.; Martano, L.; and 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**, 3460-3467.
- Carroll, R.; Peterlin, B. M.; and Derse, D.** (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Tat activity by coexpression of heterologous trans activators. *J. Virol.*, **66**, 2000-2007.
- Carruth, L. M.; Morse, B. A.; and Clements, J. E.** (1996). The Leucine Domain of the Visna Virus Tat Protein Mediates Targeting to an AP-1 Site in Viral Long Terminal Repeat. *J. Virol.*, **70**, 4338-4344.
- Carvalho, M. & Derse, D.** (1991). Mutational analysis of the equine infectious anemia virus Tat-responsive element. *J. Virol.*, **65**, 3468-3474.
- Cheevers, W. P. & McGuire, T. C.** (1985). Equine infectious anemia virus: immunopathogenesis and persistence. *Rev. Infect. Dis.*, **7**, 83-88.
- Cheevers, W. P. & McGuire, T. C.** (1988). The lentiviruses: maedi/visna, caprine arthritis encephalitis and equine infectious anemia. *Adv. Virus Res.*, **34**, 189-215.

- Chen, L. & Frankel, A. D.** (1994). An RNA-binding peptide from bovine immunodeficiency virus Tat protein recognizes an unusual RNA structure. *Biochemistry*, **33**, 2708-2715.
- Chen, D.; Fong, Y.; and Zhou, Q.** (1999). Specific interaction of Tat with the human but not rodent P-TEFb complex mediates the species-specific Tat activation of HIV-1 transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2728-2733.
- Chung, H.-K. & Derse, D.** (2001). Binding Sites for Rev and ASF/SF2 Map to a 55-Nucleotide Purine-rich Exonic Element in Equine Infectious Anemia Virus RNA. *J. Biol. Chem.*, **276** (22), 18960- 18967.
- Churcher, M. J.; Lamont, C.; Hamy, F.; Dingwall, C.; Green, S. M.; Lowe, A. D.; Butler, J. G.; Gait, M. J.; and 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.; and Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2210-2214.
- 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.; and Colonno, R. J.** (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. USA*, **87**, 8985-8989.
- Cullen, B. R. & Malim, M. H.** (1991). The HIV-1 Rev protein: prototype of a novel class of eukaryotic post-transcriptional regulators. *TIBS*, **16**, 346-350.
- Daelemans, D.; Schols, D.; Witvrouw, M.; Pannecouque, C.; Hatse, S.; Van Dooren, S.; Hamy, F.; Klimkait, T.; De Clercq, E.; and Vandamme, A.-M.** (2000). A Second Target for the Peptoid Tat/Transactivation Response Element Inhibitor CGP64222: Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Replication by Blocking CXC-Chemokine Receptor 4-Mediated Virus Entry. *Mol. Pharmacol.*, **57**, 116-124.
- Daelemans, D.; De Clercq, E.; and Vandamme, A.-M.** (2001). A quantitative GFP-based bioassay for the detection of HIV-1 Tat transactivation inhibitors. *J. Virol. Methods*, **96**, 183-188.

- Das, A.** (1992). How the phage Lambda *N* gene product suppresses transcription termination: communication of RNA polymerase with regulatory proteins mediated by signals in nascent RNA. *J. Bacteriol.*, **174**, 6711-6716.
- Dasgupta, S. & Bell, J. A.** (1993). Design of helix ends. Amino acid preferences, hydrogen bonding and electrostatic interactions. *Int. J. Pept. Protein. Res.*, **41**, 499-511.
- De Azevedo, Jr., W. F.; Canduri, F.; and Da Silveira, N. J. F.** (2002). Structural basis for inhibition of cyclin-dependent kinase 9 by flavopiridol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 566-571.
- De Falco, G. & Giordano, A.** (1998). CDK9 (PITALRE): A Multifunctional cdc2-Related Kinase. *J. Cell. Physiol.*, **177**, 501-506.
- Delling, U.; Roy, S.; Sumner-Smith, M.; Barnett, R.; Reid, L.; Rosen, C. A.; and 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. USA*, **88**, 6234-6238.
- Derse, D. & Newbold, S. H.** (1993). Mutagenesis of EIAV TAT Reveals Structural Features Essential for Transcriptional Activation and TAR Element Recognition. *Virology*, **194**, 530-536.
- Desai, K.; Loewenstein, P. M.; and Green, M.** (1991). Isolation of a cellular protein that binds to the human immunodeficiency Tat protein and can potentiate transactivation of the viral promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8875-8879.
- Dingwall, C.; Ernberg, I.; Gait, M. J.; Green, S. M.; Heaphy, S.; Karn, J.; Lowe, A. D.; Singh, M.; Skinner, M. A.; and Valerio, R.** (1989). Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6925-6929.
- Dingwall, C.; Ernberg, I.; Gait, M. J.; Green, S. M.; Heaphy, S.; Karn, J.; Lowe, A. D.; Singh, M.; and 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**, 4145-4153.
- Dorr, A.; Kiermer, V.; Pedal, A.; Rackwitz, H.-R.; Henklein, P.; Schubert, U.; Zhou, M.-M.; Verdin, E.; and Ott, M.** (2002). Transcriptional synergy between Tat and PCAF is dependent on the binding of acetylated Tat to the PCAF bromodomain. *EMBO J.*, **21**, 2715-2723.
- Dower, W. J.; Miller, J. F.; and Ragsdale, C. W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145.

- Edison, A. S.; Abildgaard, F.; Westler, W. M.; Mooberry, E. S.; and Markley, J. L.** (1994). Practical introduction to theory and implementation of multinuclear, multidimensional nuclear magnetic resonance experiments. *Methods Enzymol*, **239**, 3-79.
- Emerman, M. & Malim, M. H.** (1998). HIV-1 Regulatory/Accessory Genes: Keys to Unraveling Viral and Host Cell Biology. *Science*, **280**, 1880-1884.
- Emerman, M.; Guyader, M.; Montagnier, L.; Baltimore, D.; and Muesing, M. A.** (1987). The specificity of the human immunodeficiency virus type 2 transactivator is different from that of human immunodeficiency virus type 1. *EMBO J.*, **6**, 3755-3760.
- Endo, S.; Kubota, S.; Siomi, H.; Adachi, A.; Oroszlan, S.; Maki, M.; and 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.
- Ensoli, B.; Barillari, G.; Salahuddin, S. Z.; Gallo, R. C.; and Staal, F. W.** (1990). Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cell derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature*, **345**, 84-86.
- Ensoli, B. & Cafaro, A.** (1996). HIV-1 and Kaposi's sarcoma. *Eur. J. Cancer Prev.*, **5**, 410-412.
- Faber, C.; Sticht, H.; Schweimer, K.; and Rösch, P.** (2000). Structural Rearrangements of HIV-1 Tat-responsive RNA upon Binding of Neomycin B. *J. Biol. Chem.*, **275**, 20660-20666.
- Feng, S. & Holland, E. C.** (1988). HIV-1 *tat* trans-activation requires the loop sequence within *tar*. *Nature*, **334**, 165-167.
- Frankel, A. D. & Young, J. A. T.** (1998). HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 1-25.
- Fujinaga, K.; Cujec, T. P.; Peng, J.; Garriga, J.; Price, D. H.; Graña, X.; and Peterlin, B. M.** (1998). The Ability of Positive Transcription Elongation Factor b to transactivate Human Immunodeficiency Virus Transcription depends on a Functional Kinase Domain, Cyclin T1, and Tat. *J. Virology*, **72**, 7154-7159.
- Fujinaga, K.; Taube, R.; Wimmer, J.; Cujec, T. P.; and Peterlin, B. M.** (1999). Interactions between Human Cyclin T, Tat, and the transactivation Response Element (TAR) are disrupted by a Cysteine to Tyrosine Substitution found in Mouse Cyclin T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **96**, 1285-1290.
- Gait, M. J. & Karn, J.** (1993). RNA recognition by the human immunodeficiency virus Tat and Rev proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 255-259.

- Gallo, R. C.; Salahuddin, S. Z.; Popovic, M.; Shearer, G. M.; Kaplan, M.; Haynes, B. F.; Palker, T. J.; Redfield, R.; Oleske, J.; Safai, B.; et al.** (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, **224**, 500-503.
- Garber, M. E.; Wei, P.; KewalRamani, V. N.; Mayall, T. P.; Herrmann, C. H.; Rice, A. P.; Littman, D. R.; and Jones, K.** (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**, 3512-3527.
- Garber, M. E.; Mayall, T. P.; Suess, E. M.; Meisenhelder, J.; Thompson, N. E. & Jones, K. A.** (2000). CDK9 Autophosphorylation regulates High-Affinity Binding of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat-P-TEFb Complex to TAR RNA. *Mol. Cell. Biol.*; **20** (18), 6958-6969.
- Garcia, J. A., Harrich, D.; Pearson, L.; Mitsuyasu, R.; and Gaynor, R. B.** (1988). Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J.*, **7**, 3143-3147.
- Garcia, J. A., Harrich, D.; Soutanikas, E.; Wu, F.; Mitsuyasu, R.; and Gaynor, R. B.** (1989). Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. *EMBO J.*, **8**, 765-778.
- Garcia-Martinez, L. M.; Mavankal, G.; Neveu, J. M.; Lane, W. S.; Ivanov, D.; and Gaynor, R. B.** (1997). Purification of a tat-associated kinase reveals a TFIID complex that modulates HIV-1 transcription. *Embo J.*, **16**, 2836-2850.
- Gavriil, E. S.; Cooney, R.; and Weeks, B. S.** (2000). Tat mediates Apoptosis *in vivo* in the Rat Central Nervous System. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 252-256.
- Gill, S. C. & Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- Gold, M. O.; Yang, X.; Herrmann, C. H.; and Rice, A. P.** (1998). PITALRE, the Catalytic Subunit of TAK, Is Required for Human Immunodeficiency Virus Tat Transactivation *In Vivo*. *J. Virol.*, **72**, 4448-4453.
- Grant, S. G.; Jessee, J.; Bloom, F. R.; and Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4645-4649.
- Greenblatt, J.; Nodwell, J. R.; and Mason, S. W.** (1993). Transcriptional antitermination. *Nature*, **364**, 401-406.

- Greenblatt, J.; Mah, T.-F.; Legault, P.; Mogridge, J.; Li, J.; and Kay L.E.** (1998). Structure and mechanism in transcriptional antitermination by the bacteriophage N protein. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **63**, 327-336.
- 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.
- Gross, E.** (1967). The cyanogen bromide reaction. *Meth. Enzymol.*, **11**, 238-255.
- Hamy, F.; Asseline, U.; Grasby, J.; Iwai, S.; Pritchard, C.; Slim, G.; Butler, P. J.; Karn, J.; and Gait, M. J.** (1993). Hydrogen-bonding contacts in the major groove are required for human immunodeficiency virus type-1 tat protein recognition of TAR RNA. *J. Mol. Biol.*, **230**, 111-123.
- Hamy, F.; Felder, E. R.; Heizmann, G.; Lazdins, J.; Aboul-Ela, F.; Varani, G.; Karn, J.; and Klimkait, T.** (1997). An inhibitor of the Tat/TAR RNA interaction that effectively suppresses HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3548-3553.
- Hamy, F.; Brondani, V.; Flörsheimer, A.; Stark, W.; Blommers, M. J. J.; and Klimkait, T.** (1998). A New Class of HIV-1 Tat Antagonist Acting through Tat-TAR Inhibition. *Biochemistry*, **37**, 5086-5095.
- Hamy, F.; Gelus, N.; Zeller, M.; Lazdins, J. L.; Bailly, C.; and Klimkait, T.** (2000). Blocking HIV replication by targeting Tat protein. *Chem. Biol.*, **7**, 669-676.
- Hanahan, D.** (1983). Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Harrich, D. & Hooker, B.** (2002). Mechanistic aspects of HIV-1 reverse transcription initiation. *Rev. Med. Virol.*, **12**, 31-45.
- Harrich, D.; Ulich, C.; Garcia-Martinez, L. F.; and Gaynor, R. B.** (1997). tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *EMBO J.*, **16**, 1224-1235.
- Haseltine, W. A.** (1991). Molecular Biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.*, **5**, 2349-2360.
- Hel, Z.; Johnson, J. M.; Tryniszewska, E.; Tsai, W.-P.; Harrod, R.; Fullen, J.; Tartaglia, J.; and Franchini, G.** (2002). A novel chimeric Rev, Tat, and Nef (Retanef) antigen as a component of an SIV/HIV vaccine. *Vaccine*, **20**, 3171-3186.
- 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**, 1612-1620.

- Hoffman, D. W. & White, S. W.** (1995). NMR analysis of the *trans*-activation response (TAR) RNA element of equine infectious anemia virus. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4058-4065.
- Hoffmann, S.** (1998). In vitro- und in vivo-Selektion an den lentiviralen Transaktivator-Proteinen aus HIV-1 und ELAV. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Hoffmann, S. & Willbold, D.** (1997). A Selection System to Study Protein-RNA Interactions: Functional Display of HIV-1 Tat Protein on Filamentous Bacteriophage M13. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 806-811.
- Huq, I.; Ping, Y.-H.; Tamilarasu, N.; and Rana, T. M.** (1999a). Controlling Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression by Unnatural Peptides. *Biochemistry*, **38**, 5172-5177.
- Huq, I.; Tamilarasu, N.; and Rana, T. M.** (1999b). Visualizing tertiary folding of RNA and RNA-protein interactions by a tethered iron chelate: analysis of HIV-1 Tat-TAR complex. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1084-1093.
- Ivanov, D.; Kwak, Y. T.; Nee, E.; Guo, J.; Garcia-Martinez, L. F.; and 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.
- Jayasuriya, H.; Lingham, R. B.; Graham, P.; Quamina, D.; Herranz, L.; Genilloud, O.; Gagliardi, M.; Danzeisen, R.; Tomassini, J. E.; Zink, D. L.; Guan, Z.; and Singh, S. B.** (2002). Durhamycin A, a Potent Inhibitor of HIV Tat Transactivation. *J. Nat. Prod.*, **65**, 1091-1095.
- Jessee, J.** (1986). New subcloning efficiency competent cells: > 10⁶ transformants/μg. *Focus*, **8/4**, 9-10.
- Johnson, B. A. & Blevins, R. A.** (1994). NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR*, **4**, 603-614.
- Jonas, G.** (2002). In vitro-Selektion am lentiviralen Transaktivator-Protein aus HIV-1. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Kamine, J.; Loewenstein, P.; and Green, M.** (1991). Mapping of HIV-1 Tat protein sequences required for binding to TAR RNA. *Virology*, **182**, 570-577.
- Kashanchi, F.; Piras, G.; Radonovich, M. F.; Duvall, J. F.; Fattaey, A.; Chiang, C.-M.; Roeder, R. G.; and Brady, J. N.** (1994). Direct interaction of human TFIID with the HIV-1 transactivator Tat. *Nature*, **367**, 295-299.
- Katsamba, P. S.; Myszka, D. G.; and Laird-Offringa, I. A.** (2001). Two Functionally Distinct Steps Mediate High Affinity Binding of U1A Protein to U1 Hairpin II RNA. *J. Biol. Chem.*, **276**, 21476-21481.

- Kaushik, N.; Basu, A.; Palumbo, P.; Myers, R. L.; and Pandey, V. N.** (2002). Anti-TAR Polyamide Nucleotide Analog Conjugate with a Membrane-Permeating Peptide Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Production. *J. Virol.*, **76**, 3881-3891.
- Keen, N. J.; Gait, M. J.; and Karn, J.** (1996). Human immunodeficiency virus type-1 Tat is an integral component of the activated transcription-elongation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2505-2510.
- Keen, N. J.; Churcher, M. J.; and 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.
- Kiernan, R. E.; Vanhulle, C.; Schiltz, L.; Adam, E.; Xiao, H.; Maudoux, F.; Calomme, C.; Burny, A.; Nakatani, Y.; Jeang, K.-T.; Benkirane, M.; and Van Lint, C.** (1999). HIV-1 Tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J.*, **18**, 6106-6118.
- Kiernan, R. E.; Emiliani, S.; Nakayama, K.; Castro, A.; Labbé, J. C.; Lorca, T.; Nakayama, K.-I.; and Benkirane, M.** (2001). Interaction between Cyclin T1 and SCF^{SKP2} Targets CDK9 for Ubiquitination and Degradation by the Proteasome. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 7956-7970.
- Kim, K. K.; Chamberlin, H. M.; Morgan, D. O.; and Kim, S. H.** (1996). Three-Dimensional Structure of Human Cyclin h, a Positive Regulator of the CDK-activating Kinase. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 849-855.
- Kim, S.; Byrn, R.; Groopman, J.; and Baltimore, D.** (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J. Virol.*, **63**, 3708-3713.
- Klostermeier, D.; Bayer, P.; Kraft, M.; Frank, R. W.; and Rösch, P.** (1997). Spectroscopic investigations of HIV-1 *trans*-activator and related peptides in aqueous solutions. *Biophys. Chem.*, **63**, 87-96.
- Kuppuswamy, M.; Subramanian, T.; Srinivasan, A.; and Chinnadurai, G.** (1989). Multiple functional domains of Tat, the *trans*-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3551-3561.
- Kwak, Y. T.; Ivanov, D.; Guo, J.; Nee, E.; and 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.

- Landt, O.; Grunert, H.-P.; and Hahn, U.** (1990). A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene*, **96**, 125-128.
- Li, F.; Puffer, B. A.; and Montelaro, R. C.** (1998). The S2 Gene of Equine Infectious Anemia Virus is Dispensable for Viral Replication *in vitro*. *J. Virol.*, **72** (10), 8344-8348.
- Lind, K. E.; Du, Z.; Fujinaga, K.; Peterlin, B. M.; and James, T. L.** (2002). Structure-Based Computational Database Screening, In Vitro Assay, and NMR Assessment of Compounds that Target TAR RNA. *Chem. Biol.*, **9**, 185-193.
- Liu, Y.; Wang, Z.; and Rana, T. M.** (1996). Visualizing a Specific Contact in the HIV-1 Tat Protein Fragment and *trans*-Activation Responsive Region RNA Complex by Photocross-linking. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10391-10396.
- Long, K. S. & Crothers, D. M.** (1995). Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat-derived peptides with TAR RNA. *Biochemistry*, **34**, 8885-8895.
- Long, K. S. & Crothers, D. M.** (1999). Characterization of the Solution Conformations of Unbound and Tat Peptide-Bound Forms of HIV-1 TAR RNA. *Biochemistry*, **38**, 10059-10069.
- Mancebo, H. S. Y.; Lee, G.; Flygare, J.; Tomassini, J.; Luu, P.; Zhu, Y.; Peng, J.; Blau, C.; Hazuda, D.; Price, D.; and Flores, O.** (1997). P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Gen. Dev.*, **11**, 2633-2644.
- Marion, D.; Driscoll, P. C.; Kay, L. E.; Wingfield, P. T.; Bax, A.; Gronenborn, A. M.; and Clore, G. M.** (1989a). Overcoming the overlap problem in the assignment of ¹H NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear ¹H-¹⁵N Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1 beta. *Biochemistry*, **28**, 6150-6156.
- Marion, D.; Kay, L. E.; Sparks, S. W.; Torchia, D. A.; and Bax, A.** (1989b). Three-dimensional heteronuclear NMR of ¹⁵N-labeled proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1515-1517.
- Mayhood, T.; Kaushik, N.; Pandey, P. K.; Kashanchi, F.; Deng, L.; and Pandey, V. N.** (2000). Inhibition of Tat-Mediated Transactivation of HIV-1 LTR Transcription by Polyamide Nucleic Acid Targeted to TAR Hairpin Element. *Biochemistry*, **39**, 11532-11539.
- McGuire, T. C.; O'Rourke, K. I.; and Perryman, L. E.** (1989). Immunopathogenesis of equine infectious anemia lentivirus disease. *Dev. Biol. Stand.*, **72**, 31-37.

- Metzger, A. U.; Schindler, T.; Willbold, D.; Kraft, M.; Steegborn, C.; Volkmann, A.; Frank, R. W.; and Rösch, P.** (1996). Structural rearrangements on HIV-1 Tat (32-72) TAR complex formation. *FEBS Lett.*, **384**, 255-259.
- Metzger, A. U.; Bayer, P.; Willbold, D.; Hoffmann, S.; Frank, R. W.; Goody, R. S.; and 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. Commun.*, **241**, 31-36.
- Meyer, O. & Schlegel, H. G.** (1983). Biology of carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **37**, 277-310.
- Morini, M.; Benelli, R.; Giunciuglio, D.; Carlone, S.; Arena, G.; Noonan, D. M.; and Albini, A.** (2000). Kaposi's Sarcoma Cells of Different Etiologic Origins Respond to HIV-Tat through the Flk-1/KDR (VEGFR-2): Relevance in AIDS-KS Pathology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 267-271.
- Morse, B. A.; Carruth, L. M.; and Clements, J. E.** (1999). Targeting of the Visna Virus Tat Protein to Ap-1 Sites: Interactions with the bZip Domains of Fos and Jun *In Vitro* and *In Vivo*. *J. Virol.*, **73**, 37-45.
- Muesing, M. A.; Smith, D. H.; Capon, D. J.** (1987). Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus transactivator protein. *Cell*, **48**, 691-701.
- Mujeeb, A.; Bishop, K.; Peterlin, B. M.; Turck, C.; Parslow, T. G.; and James, T. L.** (1994). NMR structure of a biologically active peptide containing the RNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 Tat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8248-8252.
- Mujtaba, S.; He, Y.; Zeng, L.; Farooq, A.; Carlson, J. E.; Ott, M.; Verdin, E.; and Zhou, M. M.** (2002). Structural Basis of Lysine-Acetylated HIV-1 Tat Recognition by PCAF Bromodomain. *Mol. Cell.*, **9**, 575-586.
- Nabel, G. J.** (2001). Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine. *Nature*, **410**, 1002-1007.
- Nabel, G. & Baltimore, D.** (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T-Cell. *Nature*, **326**, 711-713.
- Nakatani, Y.** (2002). HIV-1 Transcription: Activation Mediated by Acetylation of Tat. *Structure*, **10**, 443-444.
- Nguyen, V. T.; Kiss, T.; Michels, A. A.; and Bensaude, O.** (2001). 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature*, **414**, 322-325.

- Noiman, S.; Yaniv, A.; Tsach, T.; Miki, T.; Tronick, S. R.; and Gazit, A.** (1991). The Tat protein of equine infectious anemia virus is encoded by at least three types of transcripts. *Virology*, **184**, 521-530.
- Ohana, B.; Moore, P. A.; Ruben, S. M.; Southgate, C. D.; Green, M. R.; and Rosen, C. A.** (1993). The type 1 human immunodeficiency virus Tat binding protein is a transcriptional activator belonging to an additional family of evolutionarily conserved genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 138-142.
- Park, I.-W.; Ullrich, C. K.; Schoenberger, E.; Ganju, R. K.; and Groopman, J. E.** (2001). HIV-1 Tat induces Microvascular Endothelial Apoptosis through Caspase Activation. *J. Immunol.*, **167**, 2766-2771.
- Patino, N.; Di Giorgio, C.; Dan-Covalciuc, C.; Peytou, V.; Terreux, R.; Cabrol-Bass, D.; Bailly, C.; and Condom, R.** (2002). Modelling, synthesis and biological evaluation of an ethidium-arginine conjugate linked to a ribonuclease mimic directed against TAR RNA of HIV-1. *Eur. J. Med. Chem.*, **37**, 573-584.
- Peng, J.; Marshall, N. F.; and Price, D. H.** (1998a). Identification of a Cyclin Subunit Required for the Function of *Drosophila* P-TEFb. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13855-13860.
- Peng, J.; Zhu, Y.; Milton, J. T.; and Price, D. H.** (1998b). Identification of Multiple Cyclin Subunits of Human P-TEFb. *Genes & Dev.*, **12**, 755-762.
- Ping, Y.-H. & Rana, T. M.** (2001). DSIF and NELF Interact with RNA Polymerase II Elongation Complex and HIV-1 Tat Stimulates P-TEFb-mediated Phosphorylation of RNA Polymerase II and DSIF during Transcription Elongation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 12951-12958.
- Popovic, M.; Sarngadharan, M. G.; Read, E.; and Gallo, R. C.** (1984). Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, **224**, 497-500.
- Price, D.** (2000). MINIREVIEW: P-TEFb, a Cyclin-Dependent Kinase Controlling Elongation by RNA Polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 2629-2634.
- Puglisi, J. D.; Chen, L.; Blanchard, S.; and Frankel, A. D.** (1995). Solution Structure of a Bovine Immunodeficiency Virus Tat-TAR Peptide-RNA Complex. *Science*, **270**, 1200-1203.
- Rice, A. P. & Carlotti, F.** (1990a). Mutational analysis of the conserved cysteine-rich region of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *J. Virol.*, **64**, 1864-1868.
- Rice, A. P. & Carlotti, F.** (1990b). Structural analysis of wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1 Tat proteins. *J. Virol.*, **64**, 6018-6026.

- Richter, S.; Cao, H.; and Rana, T. M.** (2002a). Specific HIV-1 TAR RNA Loop Sequence and Functional Groups Are Required for Human Cyclin T1-Tat-TAR Ternary Complex Formation. *Biochemistry*, **41**, 6391-6397.
- Richter, S.; Ping, Y.-H.; and Rana, T. M.** (2002b). TAR RNA loop: A scaffold for the assembly of a regulatory switch in HIV replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7928-7933.
- Rösch, P. & Willbold, D.** (1996). Is EIAV Tat Protein a Homeodomain? *Science*, **272**, 1672.
- Rosin-Arbesfeld, R.; Mashiah, P.; Willbold, D.; Rösch, P.; Tronick, S. R.; Yaniv, A.; and Gazit, A.** (1994). Biological Activity and Intracellular Location of the Tat Protein of Equine Infectious Anemia Virus. *Gene*, **150**, 307-311.
- Rosin-Arbesfeld, R.; Yaniv, A. ; and Gazit, A.**(2000). Suboptimal splice sites of equine infectious anemia virus control Rev responsiveness. *J. Gen. Virol.*, **81**, 1265-1272.
- Rous, P.** (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent seperable from the tumor cells. *J. Exp. Med.*, **13**, 397.
- Roy, S.; Delling, U.; Chen, C. H.; Rosen, C. A.; and Sonenberg, N.** (1990a). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required Tat binding and Tat mediated transactivation. *Genes Dev.*, **4**, 1365-1373.
- Roy, S.; Parkin, N. T.; Rosen, C.; Itovitch, J.; and Sonenberg, N.** (1990b). Structural requirements for trans activation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-directed gene expression by tat: importance of base pairing, loop sequence, and bulges in the tat-responsive sequence. *J. Virol.*, **64**, 1402-1406.
- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sausville, E. A.** (2002). Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends Mol. Med.*, **8**, 32-37.
- Schärfp, M.; Sticht, H.; Schweimer, K.; Boehm, M.; Hoffmann, S.; and Rösch, P.** (2000). Antitermination in bacteriophage λ - The structure of he N36 peptide-*boxB* RNA complex. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2397-2408.

- Schmid, F. X.** (1989). Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: *Protein structure. A practical approach* (Creighton, T. E., ed.), pp. 251-285, IRL Press, Oxford.
- Schweimer, J.-K.** (1997). *Linear Prediction, spektrale Dekonvolution und digitale Filter – Hilfsmittel zur Prozessierung mehrdimensionaler NMR Daten*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- Schweimer, J.-K.** (2000). *Mehrdimensionale heteronukleare NMR Spektroskopie zur Bestimmung der Strukturen des Birkenpollenallergens Bet v 1, des Guillardia theta Rubredoxins und des [2Fe-2S] Ferredoxins aus Halobacterium salinarium*. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Seewald, M. J.; Metzger, A. U.; Willbold, D.; Rösch, P.; and Sticht, H.** (1998). Structural Model of the HIV-1 Tat(46-58)-TAR Complex. *J. Biomol. Structure & Dynamics*, **16**, 683-692.
- Selby, M. J.; Bain, E. S.; Luciw, P. A.; and Peterlin, B. M.** (1989). Structure, sequence and position of the stem-loop in TAR determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes Dev.*, **3**, 547-558.
- Sodroski, J.; Rosen, C.; Wong-Staal, F.; Salahuddin, S.; Popovic, M.; Arya, S.; Gallo, R. C.; Haseltine, W. A.** (1985). *Trans-acting* transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science*, **227**, 171-173.
- Sticht, H.; Willbold, D.; Bayer, P.; Ejchart, A.; Herrmann, F.; Rosin-Arbesfeld, R.; Gazit, A.; Yaniv, A.; Frank, R.; and Rösch, P.** (1993). Equine infectious anemia virus *Tat* is a predominantly helical protein. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 973-976.
- Sticht, H.; Willbold, D.; Ejchart, A.; Rosin-Arbesfeld, R.; Yaniv, A.; Gazit, A.; and Rösch, P.** (1994). Trifluoroethanol stabilizes a helix-turn-helix motif in equine infectious-anemia-virus *trans-activator* protein. *Eur. J. Biochem.*, **225**, 855-861.
- Suñé, C.; Goldstrohm, A. C.; Peng, J.; Price, D. H.; and Garcia-Blanco, M. A.** (2000). An *In Vitro* Transcription System that recapitulates Equine Infectious Anemia Virus Tat-Mediated Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Activity demonstrates a Role for Positive Transcription Elongation Factor b and Associated Proteins in the Mechanism of Tat Activation. *Virology*, **274**, 356-366.
- 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. USA*, **90**, 1571-1575.

- Taube, R.; Fujinaga, K.; Wimmer, J.; Barboric, M.; and Peterlin, B. M.** (1999). Tat Transactivation: A Model for the Regulation of Eukaryotic Transcription Elongation. *Virology*, **264**, 245-253.
- Taube, R.; Fujinaga, K.; Irwin, D.; Wimmer, J.; Geyer, M.; and Peterlin, B. M.** (2000). Interactions between Equine Cyclin T1, Tat, and TAR are disrupted by a Leucine-to-Valine Substitution found in Human Cyclin T1. *J. Virology*, **74**, 892-898.
- Taube, R.; Lin, X.; Irwin, D.; Fujinaga, K.; and Peterlin, B. M.** (2002). Interaction between P-TEFb and the C-terminal Domain of RNA Polymerase II Activates Transcriptional Elongation from Sites Upstream or Downstream of Target Genes. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 321-331.
- Temin, H. M. & Mizutani, S.** (1970). An RNA dependent DNA Polymerase in virions of Rous-Sarcoma-Virus. *Nature*, **226**, 1211-1213.
- Thomas, M. R.** (1994). Simple, effective cleanup of DNA ligation reactions prior to electrotransformation of *E. coli*. *Biotechniques*, **16**, 988-990.
- Tok, J. B.-H.; Des Jean, R. C.; and Fenker, J.** (2001). Binding of Cyclic BIV β -Tat Peptide with its TAR RNA Construct. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 43-46.
- Turner, B. G. & Summers, M. F.** (1999). Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1-32.
- Veljkovic, V.; Metlas, R.; Köhler, H.; Urnovitz, H. B.; Prljic, J.; Veljkovic, N.; Johnson, E.; and Müller, S.** (2001). AIDS epidemic at the beginning of the third millenium: time for a new AIDS vaccine strategy. *Vaccine*, **19**, 1855-1862.
- Veschambre, P.; Simard, P.; and Jalinot, P.** (1995). Evidence for functional interaction between the HIV-1 Tat transactivator and the TATA box binding protein *in vivo*. *J. Mol. Biol.*, **250**, 169-180.
- Vogel, J.; Hinrichs, S. H.; Reynolds, R. K.; Luciw, P. A.; and Jay, G.** (1988). The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature*, **335**, 606-611.
- Wang, Z.; Huq, I.; and Rana, T. M.** (1999). Proximity of a Tat Peptide to the HIV-1 TAR RNA Loop Region Determined by Site-Specific Photo-Cross-Linking. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 512-519.
- Wang, Z.; Shah, K.; and Rana, T. M.** (2001). Probing Tat Peptide-TAR RNA Interactions by Psoralen Photo-Cross-Linking. *Biochemistry*, **40**, 6458-6464.
- Weeks, K. M. & Crothers, D. M.** (1991). RNA recognition by Tat-derived peptides: interaction in the major groove? *Cell*, **66**, 577-588.

- Wei, P.; Garber, M. E.; Fang, S.-M.; Fischer, W. H.; and 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**, 451-462.
- Willbold, D.** (1993). *Die Struktur des Transaktivator-Proteins aus dem Pferdeanämie-Virus in Lösung*. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Willbold, D.; Krüger, U.; Frank, R.; Rosin-Arbesfeld, R.; Gazit, A.; Yaniv, A.; and Rösch, P.** (1993). Sequence-Specific Resonance Assignments of the ¹H-NMR Spectra of a Synthetic, Biologically Active EIAV Tat Protein. *Biochemistry*, **32**, 8439-8445.
- Willbold, D.; Rosin-Arbesfeld, R.; Sticht, H.; Frank, R.; and Rösch, P.** (1994). Structure of the Equine Infectious Anemia Virus Tat Protein. *Science*, **264**, 1584-1587.
- Willbold, D.; Sticht, H.; Volkmann, A.; Metzger, A.; Rosin-Arbesfeld, R.; Gazit, A.; Yaniv, A.; Frank, R.; and Rösch, P.** (1996). Structural Studies on the equine infectious anemia virus *trans*-activator protein. *Eur. J. Biochem.*, **240**, 45-52.
- Willbold, D.; Metzger, A. U.; Sticht, H.; Gallert, K. C.; Voit, R.; Dank, N.; Bayer, P.; Krauss, G.; Goody, R. S.; and Rösch, P.** (1998). Equine Infectious Anemia Virus Transactivator is a Homeodomain-type Protein. *J. Mol. Biol.*, **277**, 749-755.
- Wimmer, J.; Fujinaga, K.; Taube, R.; Cujec, T. P.; Zhu, Y.; Peng, J.; Price, D. H.; and Peterlin, B. M.** (1999). Interactions between Tat and TAR and Human Immunodeficiency Virus Replication are Facilitated by Human Cyclin T1 but not Cyclins T2a or T2b. *Virology*, **255**, 182-189.
- Yamaguchi, Y.; Takagi, T.; Wada, T.; Yano, K.; Furuya, A.; Sugimoto, S.; Hasegawa, J.; and Handa, H.** (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, **97**, 41-51.
- Yamaguchi, Y.; Filipovska, J.; Yano, K.; Furuya, A.; Inukai, N.; Narita, T.; Wada, T.; Sugimoto, S.; Konarska, M. M.; and Handa, H.** (2001). Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. *Cell*, **97**, 41-51.
- Yamamoto, R.; Koseki, S.; Ohkawa, J.; Murakami, K.; Nishikawa, S.; Taira, K.; and Kumar, P. K. R.** (1997). Inhibition of transcription by the TAR RNA of HIV-1 in a nuclear extract of HeLa cells. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3445-3450.
- Yamamoto, R.; Katahari, M.; Nishikawa, S.; Baba, T.; Taira, K. & Kumar, P. K. R.** (2000). A Novel RNA Motif that binds Efficiently and Specifically to the Tat Protein of HIV and inhibits the *trans*-Activation by Tat of Transcription *in vitro* and *in vivo*. *Genes to Cells*, **5**, 371-388.

- Yang, X.; Herrmann, C. H.; and Rice, A. P.** (1996). The human immunodeficiency virus Tat proteins specifically associate with TAK in vivo and require the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II for function. *J. Virol.*, **70**, 4576-4584.
- Yang, Y.; Declerck, N.; Manival, X.; Aymerich, S.; and Kochoyan, M.** (2002). Solution structure of the LicT-RNA antitermination complex: CAT clamping RAT. *The EMBO J.*, **21**, 1987-1997.
- Yang, Z.; Zhu, Q.; Luo, K.; and Zhou, Q.** (2001). The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature*, **414**, 317-322.
- Ye, X.; Kumar, R. A.; and Patel, D. J.** (1995). Molecular recognition in the bovine immunodeficiency virus Tat peptide-Tar RNA complex. *Chem. Biol.*, **2**, 827-832.
- Yen-Moore, A.; Hudnall, S. D.; Rady, P. L.; Wagner, Jr., R. F.; Moore, T. O.; Memar, O.; Hughes, T. K.; and Tyring, S. K.** (2000). Differential Expression of the HHV-8 vGCR Cellular Homolog Gene in AIDS-Associated and Classic Kaposi's Sarcoma: Potential Role of HIV-1 Tat. *Virology*, **267**, 247-251.
- Yu, L.; Loewenstein, P. M.; Zhang, Z.; and Green, M.** (1995). *In Vitro* Interaction of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Transactivator and the General Transcription Factor TFIIB with the Cellular Protein TAP. *J. Virol.*, **69**, 3017-3023.
- Zhang, J.; TAMILASURA, N.; Hwang, S.; Garber, M. E.; Huq, I.; Jones, K. A.; and Rana, T. M.** (2000). HIV-1 TAR RNA enhances the Interaction between Tat and Cyclin T1. *J. Biol. Chem.*, **44**, 34314-34319.
- Zhou, C. & Rana, T. M.** (2002). A Bimolecular Mechanism of HIV-1 Tat Protein Interaction with RNA Polymerase II Transcription Elongation Complexes. *J. Mol. Biol.*, **320**, 925-942.
- Zhou, Q.; Chen, D.; Pierstorff, E.; and Luo, K.** (1998). Transcription Elongation Factor P-TEFb mediates Tat Activation of HIV-1 Transcription at Multiple Stages. *EMBO J.*, **17**, 3681-3691.

9 Anhang

9.1 Nukleotid- und Aminosäuren-Sequenzen

Angegeben sind jeweils die Nukleotid- (Kleinbuchstaben, kursiv) und die Aminosäuren-Sequenzen (Großbuchstaben, fett). Das Stoppcodon ist mit * gekennzeichnet. Die Sequenzen von Mini_eCyc_45 bzw. Mini_eCyc_75 können dem Kapitel 3 entnommen werden (Abb. 3.10 A, Seite 58 bzw. Abb. 3.13, Seite 61)

9.1.1 hCycT1_V29L

atggagggagagaggaagaacaacaacaaacggtggtatctcactcgagaacagctggaa

M E G E R K N N N K R W Y F T R E Q L E - 20

aatagcccatcccgtcgttttgccctggaccagataaagaactttcttatcgccagcag

N S P S R R F G L D P D K E L S Y R Q Q - 40

gcggccaatctgcttcaggacatggggcagcgtcttaacgtctcacaattgactatcaac

A A N L L Q D M G Q R L N V S Q L T I N - 60

actgctatagatatacatgcatcgattctacatgattcagtccttcacacagttccctgga

T A I V Y M H R F Y M I Q S F T Q F P G - 80

aattctgtggctccagcagccttgtttctagcagctaaagtggaggagcagcccaaaaaa

N S V A P A A L F L A A K V E E Q P K K -100

ttggaacatgtcatcaaggtagcacatacttgctctccatcctcaggaatcccttcctgat

L E H V I K V A H T C L H P Q E S L P D -120

actagaagtgaggcttatttgcaacaagttcaagatctggtcattttagaaagcataatt

T R S E A Y L Q Q V Q D L V I L E S I I -140

ttgcagactttaggctttgaaactaacaattgatcaccacatactcatgtagtaaagtgc

L Q T L G F E L T I D H P H T H V V K C -160

actcaacttgttcgcgagcaagcaaggacttagcacagacttcttacttcatggcaaccaac
 T Q L V R A S K D L A Q T S Y F M A T N -180
agcctgcatttgaccacatttagcctgcagtacacacctcctgtggtggcctgtgtctgc
 S L H L T T F S L Q Y T P P V V A C V C -200
attcacctggcttgcaagtgggtccaattgggagatcccagtctcaactgacgggaagcac
 I H L A C K W S N W E I P V S T D G K H -220
tggtgggagtatgttgacgccactgtgaccttgggaacttttagatgaactgacacatgag
 W W E Y V D A T V T L E L L D E L T H E -240
tttctacagatthttggagaaaactcccaacaggctcaaacgcatttgggaattggagggca
 F L Q I L E K T P N R L K R I W N W R A -260
tgcgaggctgccaagaaaacaaaagcagatgaccgataa
 C E A A K K T K A D D R * -272

9.1.2 eCycT1

atggagggagagcgtgaagaacaacaacaaacggtgggtatthttactcgagaacagctggaa
 M E G E R K N N N K R W Y F T R E Q L E - 20
aatagtcctctcgtcgtthttggcctggaccagataaagaactthttatcgccagcag
 N S P S R R F G L D P D K E L S Y R Q Q - 40
gcgccaatctgctccaggacatggggcagcgtcttaacgtctcacaattgactatcaac
 A A N L L Q D M G Q R L N V S Q L T I N - 60
actgctatcgtatacatgcatcgattctacatgattcagtcctttacacagttccatcga
 T A I V Y M H R F Y M I Q S F T Q F H R - 80
aattctgtggctccagcggccttattthtttagcagctaaagtagaggagcagccaaaaaaa
 N S V A P A A L F L A A K V E E Q P K K -100

ttggaacacgtcatcaaagtagcacatgcttgccatccacaggaatcacttctgat
 L E H V I K V A H A C L H P Q E S L P D -120
accaggagtgaggcttacctgcaacaagttcaagatctggtgatattagaaagcataatt
 T R S E A Y L Q Q V Q D L V I L E S I I -140
ctgcagactttaggctttgagctaacaattgatcaccacatacacatgtggtaaagtgc
 L Q T L G F E L T I D H P H T H V V K C -160
actcagcttgtagagcaagcaaggacttagcacagacttcttacttcatggcaaccaac
 T Q L V R A S K D L A Q T S Y F M A T N -180
agcctgcatttgaccacatttagcctgcagtacacacctcctgtgggtggcctgtgtctgc
 S L H L T T F S L Q Y T P P V V A C V C -200
attcatctggcttgcaagtggccaactgggagatcccagtctcaactgatgggaagcac
 I H L A C K W S N W E I P V S T D G K H -220
tggtgggagtatggtgacgccactgtgaccttggaaacttttagatgaactgacacatgaa
 W W E Y V D A T V T L E L L D E L T H E -240
tttctacagattctggagaaaacccccaacaggctgaaacgaattcgggaattggagggca
 F L Q I L E K T P N R L K R I R N W R A -260
tgccaggctgccaagaaaacaaaagcagatgaccgataa
 C Q A A K K T K A D D R * -272

9.1.3 EIAV-Tat in pETATA2E

atgctcgaggatcgacggatccccgggacagcagaggagaacttacagaagtcttctgga
 M L E D R R I P G T A E E N L Q K S S G - 20
gggtgctcctggccagaacacaggaggacaggaagcaagaccaactaccattgtcagctg
 G V P G Q N T G G Q E A R P N Y H C Q L - 40

tgtttcctgaggtctctaggaattgattacctcgatgcttcattaaggaagaagaataaa

C F L R S L G I D Y L D A S L R K K N K - 60

caaagactgaaggcaatccaacaaggaagacaacctcaatattttgttataa

Q R L K A I Q Q G R Q P Q Y L L * - 75

9.2 Tabelle der zugeordneten Resonanzen von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -EIAV-Tat

Angegeben sind jeweils von links nach rechts: Sequenzposition, Aminosäure, Bezeichner, Anzahl der Protonenshifts, N oder C, chemische Verschiebung der Protonen und chemische Verschiebung des zugehörigen N- bzw. C-Atoms. Die Abkürzung n.z. bedeutet nicht zugeordnet.

1 LEU HN 1 N	n.z.	n.z.	4 ARG HG1 1 C	1,67	27,25
1 LEU HA 1 C	n.z.	n.z.	4 ARG HG2 1 C	1,64	27,25
1 LEU HB1 1 C	n.z.	n.z.	4 ARG HD1 1 C	3,22	43,42
1 LEU HB2 1 C	n.z.	n.z.	4 ARG HD2 1 C	3,22	43,22
1 LEU HG 1 C	n.z.	n.z.	4 ARG HE1 1 N	n.z.	n.z.
1 LEU HD1* 3 C	n.z.	n.z.			
1 LEU HD2* 3 C	n.z.	n.z.	5 ARG C 1 C		176,21
			5 ARG HN 1 N	8,42	122,44
2 GLU HN 1 N	n.z.	n.z.	5 ARG HA 1 C	4,32	56,19
2 GLU HA 1 C	n.z.	n.z.	5 ARG HB1 1 C	1,80	30,72
2 GLU HB1 1 C	n.z.	n.z.	5 ARG HB2 1 C	1,80	30,72
2 GLU HB2 1 C	n.z.	n.z.	5 ARG HG1 1 C	1,63	27,02
2 GLU HG1 1 C	n.z.	n.z.	5 ARG HG2 1 C	1,63	27,02
2 GLU HG2 1 C	n.z.	n.z.	5 ARG HD1 1 C	3,22	43,33
			5 ARG HD2 1 C	3,22	43,33
3 ASP HN 1 N	n.z.	n.z.	5 ARG HE1 1 N	n.z.	122,44
3 ASP HA 1 C	n.z.	n.z.			
3 ASP HB1 1 C	n.z.	n.z.	6 ILE C 1 C		n.z.
3 ASP HB2 1 C	n.z.	n.z.	6 ILE HN 1 N	8,34	124,19
			6 ILE HA 1 C	n.z.	58,82
4 ARG C 1 C		176,15	6 ILE HB 1 C	n.z.	38,70
4 ARG HN 1 N	n.z.	n.z.	6 ILE HG11 1 C	n.z.	n.z.
4 ARG HA 1 C	4,34	56,04	6 ILE HG12 1 C	n.z.	n.z.
4 ARG HB1 1 C	1,89	30,58	6 ILE HG2* 3 C	n.z.	n.z.
4 ARG HB2 1 C	1,75	30,58	6 ILE HD1* 3 C	n.z.	n.z.

7 PRO C 1 C		177,60	13 ASN C 1 C		175,66
7 PRO HA 1 C	4,42	63,70	13 ASN HN 1 N	8,46	119,08
7 PRO HB1 1 C	2,35	32,19	13 ASN HA 1 C	4,70	53,62
7 PRO HB2 1 C	1,95	32,19	13 ASN HB1 1 C	2,87	38,79
7 PRO HG1 1 C	2,13	27,56	13 ASN HB2 1 C	2,79	38,79
7 PRO HG2 1 C	2,13	27,56	13 ASN HD21 1 N	n.z.	n.z.
7 PRO HD1 1 C	3,96	50,74	13 ASN HD22 1 N	n.z.	n.z.
7 PRO HD2 1 C	3,74	50,74			
			14 LEU C 1 C		177,80
8 GLY C 1 C		174,60	14 LEU HN 1 N	8,19	122,40
8 GLY HN 1 N	8,59	109,60	14 LEU HA 1 C	4,31	55,64
8 GLY HA1 1 C	4,04	45,31	14 LEU HB1 1 C	1,88	42,24
8 GLY HA2 1 C	4,04	45,31	14 LEU HB2 1 C	1,66	42,24
			14 LEU HG 1 C	1,46	26,98
9 THR C 1 C		174,72	14 LEU HD1* 3 C	0,93	24,95
9 THR HN 1 N	8,06	113,25	14 LEU HD2* 3 C	0,90	23,73
9 THR HA 1 C	4,36	62,20			
9 THR HB 1 C	4,29	70,30	15 GLN C 1 C		176,40
9 THR HG2* 3 C	1,26	22,20	15 GLN HN 1 N	8,30	121,12
			15 GLN HA 1 C	4,30	56,38
10 ALA C 1 C		178,22	15 GLN HB1 1 C	2,14	29,10
10 ALA HN 1 N	8,54	126,08	15 GLN HB2 1 C	2,09	29,10
10 ALA HA 1 C	4,34	53,26	15 GLN HG1 1 C	2,40	33,83
10 ALA HB* 3 C	1,42	18,98	15 GLN HG2 1 C	2,40	33,83
			15 GLN HE21 1 N	n.z.	n.z.
11 GLU C 1 C		176,33	15 GLN HE22 1 N	n.z.	n.z.
11 GLU HN 1 N	8,46	119,87			
11 GLU HA 1 C	4,30	56,56	16 LYS C 1 C		176,95
11 GLU HB1 1 C	2,10	29,27	16 LYS HN 1 N	8,26	121,90
11 GLU HB2 1 C	2,04	29,27	16 LYS HA 1 C	4,34	56,77
11 GLU HG1 1 C	2,42	33,70	16 LYS HB1 1 C	1,85	33,10
11 GLU HG2 1 C	2,37	33,70	16 LYS HB2 1 C	1,81	33,10
			16 LYS HG1 1 C	1,50	24,84
12 GLU C 1 C		176,71	16 LYS HG2 1 C	1,46	24,84
12 GLU HN 1 N	8,42	121,07	16 LYS HD1 1 C	1,71	29,05
12 GLU HA 1 C	4,22	57,17	16 LYS HD2 1 C	1,71	29,05
12 GLU HB1 1 C	2,01	30,37	16 LYS HE1 1 C	n.z.	42,14
12 GLU HB2 1 C	2,01	30,37	16 LYS HE2 1 C	n.z.	42,14
12 GLU HG1 1 C	2,26	36,27			
12 GLU HG2 1 C	2,26	36,27	17 SER C 1 C		174,94
			17 SER HN 1 N	8,38	116,58
			17 SER HA 1 C	4,52	58,60

17 SER HB1 1 C	3,95	63,94	24 GLN HA 1 C	4,38	55,87
17 SER HB2 1 C	3,90	63,94	24 GLN HB1 1 C	2,14	29,51
			24 GLN HB2 1 C	2,01	29,51
18 SER C 1 C		175,14	24 GLN HG1 1 C	2,37	33,70
18 SER HN 1 N	8,44	117,80	24 GLN HG2 1 C	2,37	33,70
18 SER HA 1 C	4,53	58,90	24 GLN HE21 1 N	n.z.	n.z.
18 SER HB1 1 C	3,94	64,03	24 GLN HE22 1 N	n.z.	n.z.
18 SER HB2 1 C	3,91	64,03			
			25 ASN C 1 C		175,69
19 GLY C 1 C		174,60	25 ASN HN 1 N	8,69	120,10
19 GLY HN 1 N	8,45	110,56	25 ASN HA 1 C	4,84	53,31
19 GLY HA1 1 C	4,02	45,37	25 ASN HB1 1 C	2,91	38,82
19 GLY HA2 1 C	n.z.	45,37	25 ASN HB2 1 C	2,81	38,82
			25 ASN HD21 1 N	n.z.	n.z.
20 GLY C 1 C		173,84	25 ASN HD22 1 N	n.z.	n.z.
20 GLY HN 1 N	8,27	108,60			
20 GLY HA1 1 C	3,98	44,96	26 THR C 1 C		175,46
20 GLY HA2 1 C	n.z.	44,96	26 THR HN 1 N	8,26	113,96
			26 THR HA 1 C	4,37	62,40
21 VAL C 1 C		n.z.	26 THR HB 1 C	4,34	69,82
21 VAL HN 1 N	8,12	121,01	26 THR HG2* 3 C	1,21	21,80
21 VAL HA 1 C	n.z.	59,97			
21 VAL HB 1 C	n.z.	32,70	27 GLY C 1 C		174,90
21 VAL HG1* 3 C	n.z.	n.z.	27 GLY HN 1 N	8,54	111,10
21 VAL HG2* 3 C	n.z.	n.z.	27 GLY HA1 1 C	4,03	45,51
			27 GLY HA2 1 C	n.z.	45,51
22 PRO C 1 C		176,83			
22 PRO HA 1 C	4,75	63,68	28 GLY C 1 C		174,57
22 PRO HB1 1 C	2,40	34,38	28 GLY HN 1 N	8,40	108,90
22 PRO HB2 1 C	1,97	34,38	28 GLY HA1 1 C	3,99	45,40
22 PRO HG1 1 C	2,18	25,25	28 GLY HA2 1 C	n.z.	45,40
22 PRO HG2 1 C	2,18	25,25			
22 PRO HD1 1 C	3,69	50,22	29 GLN C 1 C		176,20
22 PRO HD2 1 C	3,52	50,22	29 GLN HN 1 N	8,35	119,72
			29 GLN HA 1 C	4,33	55,94
23 GLY C 1 C		174,33	29 GLN HB1 1 C	2,14	29,35
23 GLY HN 1 N	8,64	109,90	29 GLN HB2 1 C	1,98	29,35
23 GLY HA1 1 C	3,97	45,39	29 GLN HG1 1 C	2,38	33,80
23 GLY HA2 1 C	n.z.	45,39	29 GLN HG2 1 C	2,38	33,80
			29 GLN HE21 1 N	n.z.	n.z.
24 GLN C 1 C		175,90	29 GLN HE22 1 N	n.z.	n.z.
24 GLN HN 1 N	8,21	119,50			

30 GLU C 1 C		176,15		35 TYR C 1 C		n.z.	
30 GLU HN 1 N	8,59	121,84		35 TYR HN 1 N	n.z.	n.z.	
30 GLU HA 1 C	4,21	56,81		35 TYR HA 1 C	n.z.	n.z.	
30 GLU HB1 1 C	2,06	30,12		35 TYR HB1 1 C	n.z.	n.z.	
30 GLU HB2 1 C	1,93	30,12		35 TYR HB2 1 C	n.z.	n.z.	
30 GLU HG1 1 C	2,28	36,19		35 TYR HD* 2 C	n.z.	n.z.	
30 GLU HG2 1 C	2,28	36,19		35 TYR HE* 2 C	n.z.	n.z.	
31 ALA C 1 C		177,46		36 HIS C 1 C		n.z.	
31 ALA HN 1 N	8,33	125,16		36 HIS HN 1 N	n.z.	n.z.	
31 ALA HA 1 C	4,32	52,32		36 HIS HA 1 C	n.z.	n.z.	
31 ALA HB* 3 C	1,37	19,06		36 HIS HB1 1 C	n.z.	n.z.	
				36 HIS HB2 1 C	n.z.	n.z.	
32 ARG C 1 C		n.z.		36 HIS HD2 1 C	n.z.	n.z.	
32 ARG HN 1 N	8,29	121,20		36 HIS HE1 1 C	n.z.	n.z.	
32 ARG HA 1 C	n.z.	54,29					
32 ARG HB1 1 C	n.z.	30,29		37 CYS C 1 C		176,19	
32 ARG HB2 1 C	n.z.	30,29		37 CYS HN 1 N	n.z.	n.z.	
32 ARG HG1 1 C	n.z.	n.z.		37 CYS HA 1 C	4,59	54,28	
32 ARG HG2 1 C	n.z.	n.z.		37 CYS HB1 1 C	2,72	41,29	
32 ARG HD1 1 C	n.z.	n.z.		37 CYS HB2 1 C	2,62	41,29	
32 ARG HD2 1 C	n.z.	n.z.					
32 ARG HE1 1 N	n.z.	n.z.		38 GLN C 1 C		175,60	
				38 GLN HN 1 N	8,43	122,24	
33 PRO C 1 C		176,48		38 GLN HA 1 C	4,38	56,30	
33 PRO HA 1 C	4,36	63,47		38 GLN HB1 1 C	2,10	30,45	
33 PRO HB1 1 C	2,21	32,10		38 GLN HB2 1 C	1,97	30,45	
33 PRO HB2 1 C	1,70	32,10		38 GLN HG1 1 C	2,27	36,19	
33 PRO HG1 1 C	2,01	27,47		38 GLN HG2 1 C	2,32	36,19	
33 PRO HG2 1 C	2,01	27,47		38 GLN HE21 1 N	n.z.	n.z.	
33 PRO HD1 1 C	3,78	50,57		38 GLN HE22 1 N	n.z.	n.z.	
33 PRO HD2 1 C	3,65	50,57					
				39 LEU C 1 C		177,60	
34 ASN C 1 C		n.z.		39 LEU HN 1 N	8,74	118,30	
34 ASN HN 1 N	8,51	118,11		39 LEU HA 1 C	4,34	55,35	
34 ASN HA 1 C	n.z.	53,10		39 LEU HB1 1 C	1,69	40,94	
34 ASN HB1 1 C	n.z.	38,80		39 LEU HB2 1 C	n.z.	40,94	
34 ASN HB2 1 C	n.z.	38,80		39 LEU HG 1 C	n.z.	27,00	
34 ASN HD21 1 N	n.z.	n.z.		39 LEU HD1* 3 C	0,94	25,33	
34 ASN HD22 1 N	n.z.	n.z.		39 LEU HD2* 3 C	0,90	23,63	

40 CYS C 1 C		176,36	45 LEU C 1 C		177,80
40 CYS HN 1 N	8,03	117,22	45 LEU HN 1 N	7,98	122,79
40 CYS HA 1 C	4,59	54,54	45 LEU HA 1 C	4,33	55,30
40 CYS HB1 1 C	3,26	41,04	45 LEU HB1 1 C	1,69	42,40
40 CYS HB2 1 C	3,17	41,04	45 LEU HB2 1 C	1,55	42,40
			45 LEU HG 1 C	1,58	n.z.
41 PHE C 1 C		176,12	45 LEU HD1* 3 C	0,85	25,50
41 PHE HN 1 N	8,02	120,34	45 LEU HD2* 3 C	0,83	23,50
41 PHE HA 1 C	4,42	58,93			
41 PHE HB1 1 C	3,08	38,60	46 GLY C 1 C		174,36
41 PHE HB2 1 C	3,00	38,60	46 GLY HN 1 N	8,21	108,30
41 PHE HD* 2 C	n.z.	n.z.	46 GLY HA1 1 C	3,97	45,40
41 PHE HE* 2 C	n.z.	n.z.	46 GLY HA2 1 C	n.z.	45,40
41 PHE HZ 1 C	n.z.	n.z.			
			47 ILE C 1 C		175,84
42 LEU C 1 C		177,84	47 ILE HN 1 N	7,91	119,42
42 LEU HN 1 N	8,00	122,60	47 ILE HA 1 C	4,12	61,55
42 LEU HA 1 C	4,32	55,30	47 ILE HB 1 C	1,80	38,81
42 LEU HB1 1 C	1,71	42,39	47 ILE HG11 1 C	1,46	27,31
42 LEU HB2 1 C	1,63	42,39	47 ILE HG12 1 C	n.z.	27,31
42 LEU HG 1 C	n.z.	26,95	47 ILE HG2* 3 C	0,91	17,75
42 LEU HD1* 3 C	0,94	24,90	47 ILE HD1* 3 C	0,83	13,50
42 LEU HD2* 3 C	0,89	23,29			
			48 ASP C 1 C		174,94
43 ARG C 1 C		177,35	48 ASP HN 1 N	8,43	123,14
43 ARG HN 1 N	8,39	121,03	48 ASP HA 1 C	4,61	53,12
43 ARG HA 1 C	4,25	57,08	48 ASP HB1 1 C	2,83	38,62
43 ARG HB1 1 C	1,87	30,49	48 ASP HB2 1 C	2,79	38,62
43 ARG HB2 1 C	n.z.	30,49			
43 ARG HG1 1 C	n.z.	27,31	49 TYR C 1 C		176,50
43 ARG HG2 1 C	n.z.	27,31	49 TYR HN 1 N	8,05	120,64
43 ARG HD1 1 C	3,21	43,33	49 TYR HA 1 C	4,53	58,54
43 ARG HD2 1 C	3,21	43,33	49 TYR HB1 1 C	3,18	38,91
43 ARG HE1 1 N	n.z.	n.z.	49 TYR HB2 1 C	3,10	38,91
			49 TYR HD* 2 C	n.z.	n.z.
44 SER C 1 C		174,72	49 TYR HE* 2 C	n.z.	n.z.
44 SER HN 1 N	8,11	116,00			
44 SER HA 1 C	4,40	58,81	50 LEU C 1 C		n.z.
44 SER HB1 1 C	3,95	63,52	50 LEU HN 1 N	7,97	121,83
44 SER HB2 1 C	3,90	63,52	50 LEU HA 1 C	n.z.	n.z.
			50 LEU HB1 1 C	n.z.	n.z.

50 LEU HB2 1 C	n.z.	n.z.	56 LYS C 1 C		177,59
50 LEU HG 1 C	n.z.	n.z.	56 LYS HN 1 N	8,01	120,30
50 LEU HD1* 3 C	n.z.	n.z.	56 LYS HA 1 C	4,21	57,59
50 LEU HD2* 3 C	n.z.	n.z.	56 LYS HB1 1 C	1,92	32,78
			56 LYS HB2 1 C	1,85	32,78
51 ASP C 1 C		177,10	56 LYS HG1 1 C	1,53	25,23
51 ASP HN 1 N	n.z.	n.z.	56 LYS HG2 1 C	1,41	25,23
51 ASP HA 1 C	4,50	54,99	56 LYS HD1 1 C	1,72	29,37
51 ASP HB1 1 C	2,74	41,39	56 LYS HD2 1 C	1,72	29,37
51 ASP HB2 1 C	2,71	41,39	56 LYS HE1 1 C	n.z.	41,87
			56 LYS HE2 1 C	n.z.	41,87
52 ALA C 1 C		179,55			
52 ALA HN 1 N	8,49	124,90	57 LYS C 1 C		177,33
52 ALA HA 1 C	4,12	54,45	57 LYS HN 1 N	8,16	120,91
52 ALA HB* 3 C	1,48	18,55	57 LYS HA 1 C	4,25	57,36
			57 LYS HB1 1 C	1,88	32,83
53 SER C 1 C		175,96	57 LYS HB2 1 C	1,82	32,83
53 SER HN 1 N	8,39	114,15	57 LYS HG1 1 C	1,53	25,12
53 SER HA 1 C	4,27	60,63	57 LYS HG2 1 C	1,45	25,12
53 SER HB1 1 C	3,99	63,28	57 LYS HD1 1 C	1,71	29,06
53 SER HB2 1 C	3,94	63,28	57 LYS HD2 1 C	1,71	29,06
			57 LYS HE1 1 C	n.z.	41,96
54 LEU C 1 C		178,38	57 LYS HE2 1 C	n.z.	41,96
54 LEU HN 1 N	7,91	122,74			
54 LEU HA 1 C	4,27	56,53	58 ASN C 1 C		175,99
54 LEU HB1 1 C	1,78	41,84	58 ASN HN 1 N	8,38	118,97
54 LEU HB2 1 C	1,62	41,84	58 ASN HA 1 C	4,67	54,01
54 LEU HG 1 C	1,62	26,89	58 ASN HB1 1 C	2,87	38,79
54 LEU HD1* 3 C	0,94	25,27	58 ASN HB2 1 C	2,83	38,79
54 LEU HD2* 3 C	0,90	23,56	58 ASN HD21 1 N	n.z.	n.z.
			58 ASN HD22 1 N	n.z.	n.z.
55 ARG C 1 C		177,58			
55 ARG HN 1 N	7,99	119,41	59 LYS C 1 C		n.z.
55 ARG HA 1 C	4,19	57,79	59 LYS HN 1 N	8,25	121,38
55 ARG HB1 1 C	1,88	30,50	59 LYS HA 1 C	n.z.	n.z.
55 ARG HB2 1 C	1,84	30,50	59 LYS HB1 1 C	n.z.	n.z.
55 ARG HG1 1 C	1,67	27,63	59 LYS HB2 1 C	n.z.	n.z.
55 ARG HG2 1 C	1,67	27,63	59 LYS HG1 1 C	n.z.	n.z.
55 ARG HD1 1 C	3,22	43,42	59 LYS HG2 1 C	n.z.	n.z.
55 ARG HD2 1 C	3,22	43,42	59 LYS HD1 1 C	n.z.	n.z.
55 ARG HE1 1 N	n.z.	n.z.	59 LYS HD2 1 C	n.z.	n.z.

59 LYS HE1 1 C	n.z.	n.z.	63 LYS HD2 1 C	1,71	29,13
59 LYS HE2 1 C	n.z.	n.z.	63 LYS HE1 1 C	n.z.	41,80
			63 LYS HE2 1 C	n.z.	41,80
60 GLN C 1 C		176,80			
60 GLN HN 1 N	n.z.	n.z.	64 ALA C 1 C		178,40
60 GLN HA 1 C	4,25	56,90	64 ALA HN 1 N	8,15	124,06
60 GLN HB1 1 C	2,15	29,15	64 ALA HA 1 C	4,30	53,13
60 GLN HB2 1 C	2,10	29,15	64 ALA HB* 3 C	1,41	18,98
60 GLN HG1 1 C	2,42	34,03			
60 GLN HG2 1 C	2,42	34,03	65 ILE C 1 C		176,97
60 GLN HE21 1 N	n.z.	n.z.	65 ILE HN 1 N	8,08	119,58
60 GLN HE22 1 N	n.z.	n.z.	65 ILE HA 1 C	4,11	61,93
			65 ILE HB 1 C	1,89	38,75
61 ARG C 1 C		176,80	65 ILE HG11 1 C	1,54	27,48
61 ARG HN 1 N	8,29	121,94	65 ILE HG12 1 C	1,21	27,48
61 ARG HA 1 C	4,28	57,06	65 ILE HG2* 3 C	0,93	17,65
61 ARG HB1 1 C	1,88	30,52	65 ILE HD1* 3 C	0,86	13,36
61 ARG HB2 1 C	1,85	30,52			
61 ARG HG1 1 C	1,67	27,45	66 GLN C 1 C		176,20
61 ARG HG2 1 C	1,67	27,45	66 GLN HN 1 N	8,38	123,44
61 ARG HD1 1 C	3,23	43,44	66 GLN HA 1 C	4,33	56,08
61 ARG HD2 1 C	3,23	43,44	66 GLN HB1 1 C	2,14	29,35
61 ARG HE1 1 N	n.z.	n.z.	66 GLN HB2 1 C	2,00	29,35
			66 GLN HG1 1 C	2,36	33,67
62 LEU C 1 C		177,91	66 GLN HG2 1 C	2,40	33,67
62 LEU HN 1 N	8,19	122,00	66 GLN HE21 1 N	n.z.	n.z.
62 LEU HA 1 C	4,28	55,89	66 GLN HE22 1 N	n.z.	n.z.
62 LEU HB1 1 C	1,71	42,28			
62 LEU HB2 1 C	1,59	42,28	67 GLN C 1 C		176,60
62 LEU HG 1 C	1,60	27,00	67 GLN HN 1 N	8,59	121,85
62 LEU HD1* 3 C	0,96	24,87	67 GLN HA 1 C	4,31	56,45
62 LEU HD2* 3 C	0,89	23,85	67 GLN HB1 1 C	2,15	29,35
			67 GLN HB2 1 C	2,05	29,35
63 LYS C 1 C		176,80	67 GLN HG1 1 C	2,44	33,70
63 LYS HN 1 N	8,17	121,34	67 GLN HG2 1 C	2,44	33,70
63 LYS HA 1 C	4,24	57,17	67 GLN HE21 1 N	n.z.	n.z.
63 LYS HB1 1 C	1,84	32,71	67 GLN HE22 1 N	n.z.	n.z.
63 LYS HB2 1 C	1,80	32,71			
63 LYS HG1 1 C	1,49	24,89	68 GLY C 1 C		174,10
63 LYS HG2 1 C	1,43	24,89	68 GLY HN 1 N	8,42	109,70
63 LYS HD1 1 C	1,71	29,13	68 GLY HA1 1 C	3,99	45,34
			68 GLY HA2 1 C	n.z.	45,34

69 ARG C 1 C		176,20	73 TYR C 1 C		175,33
69 ARG HN 1 N	8,20	121,11	73 TYR HN 1 N	8,07	120,22
69 ARG HA 1 C	4,39	55,73	73 TYR HA 1 C	4,64	57,35
69 ARG HB1 1 C	1,86	30,88	73 TYR HB1 1 C	3,10	38,75
69 ARG HB2 1 C	1,75	30,88	73 TYR HB2 1 C	2,93	38,75
69 ARG HG1 1 C	1,67	26,99	73 TYR HD* 2 C	n.z.	n.z.
69 ARG HG2 1 C	1,64	26,99	73 TYR HE* 2 C	n.z.	n.z.
69 ARG HD1 1 C	3,18	43,12			
69 ARG HD2 1 C	3,18	43,12	74 LEU C 1 C		176,00
69 ARG HE1 1 N	n.z.	n.z.	74 LEU HN 1 N	8,14	123,74
			74 LEU HA 1 C	4,38	55,03
70 GLN C 1 C		n.z.	74 LEU HB1 1 C	1,60	42,43
70 GLN HN 1 N	8,47	122,45	74 LEU HB2 1 C	1,60	42,43
70 GLN HA 1 C	n.z.	54,27	74 LEU HG 1 C	1,62	26,93
70 GLN HB1 1 C	n.z.	28,87	74 LEU HD1* 3 C	0,89	25,23
70 GLN HB2 1 C	n.z.	28,87	74 LEU HD2* 3 C	0,89	23,80
70 GLN HG1 1 C	n.z.	n.z.			
70 GLN HG2 1 C	n.z.	n.z.	75 LEU C 1 C		n.z.
70 GLN HE21 1 N	n.z.	n.z.	75 LEU HN 1 N	7,68	128,30
70 GLN HE22 1 N	n.z.	n.z.	75 LEU HA 1 C	n.z.	n.z.
			75 LEU HB1 1 C	n.z.	n.z.
71 PRO C 1 C		176,66	75 LEU HB2 1 C	n.z.	n.z.
71 PRO HA 1 C	4,36	63,36	75 LEU HG 1 C	n.z.	n.z.
71 PRO HB1 1 C	2,23	32,17	75 LEU HD1* 3 C	n.z.	n.z.
71 PRO HB2 1 C	1,74	32,17	75 LEU HD2* 3 C	n.z.	n.z.
71 PRO HG1 1 C	2,01	27,56			
71 PRO HG2 1 C	2,01	27,56			
71 PRO HD1 1 C	3,82	50,60			
71 PRO HD2 1 C	3,82	50,60			
72 GLN C 1 C		175,60			
72 GLN HN 1 N	8,49	119,86			
72 GLN HA 1 C	4,22	56,15			
72 GLN HB1 1 C	2,03	29,49			
72 GLN HB2 1 C	1,95	29,49			
72 GLN HG1 1 C	2,27	33,95			
72 GLN HG2 1 C	2,27	33,95			
72 GLN HE21 1 N	n.z.	n.z.			
72 GLN HE22 1 N	n.z.	n.z.			

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2000 bis Oktober 2002 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Paul Rösch angefertigt. Ihm danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung dieses interessanten und facettenreichen Themas.

Für die Überlassung einer Probe TF53 bedanke ich mich bei Dr. Thomas Klimkait und Dr. François Hamy von der Universität Basel.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Heinrich Sticht, von dessen großem Kenntnisreichtum in Sachen EIAV-Tat und NMR-Spektroskopie ich in hohem Maße profitiert habe.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Silke Hoffmann, die mir Cyclin & Co näher gebracht und mich bei der Einarbeitung im Labor sehr unterstützt hat.

Ein großer Dank gilt dem NMR-Meister des Lehrstuhls, Dr. Kristian Schweimer, der für die Messung wichtiger Spektren jederzeit bereit und dessen Einführung in die Prozessierung und Auswertung der NMR-Spektren unersetzbar war. Für die Beantwortung zahlreicher Fragen rund um das Thema NMR bedanke ich mich außerdem bei Philipp Neudecker und Dr. Stephan Schwarzinger.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Ulrike Herzing, Nadine Herz, Petra Deuerling und Andrea Hager, die unermüdlich TAR-RNA, EIAV-Tat, SDS-Gele und viele andere Labormaterialien zur Verfügung gestellt oder NMR-Proben gemessen haben, damit die Forschung nie ruhen musste.

Für anregende Diskussionen gilt mein Dank insbesondere Sabine Schwarz, Finn Bauer und Ulrich Scheckenhofer sowie allen anderen Lehrstuhlangehörigen.

Für die schnelle und vor allem kompetente Lösung aller Computer- und Verwaltungsprobleme bedanke ich mich bei Rainer Hofmann, Gudrun Wagner und Angela Rösler.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir diese Ausbildung ermöglichten und mich jederzeit unterstützen.

Der größte Dank aber geht an meine Frau Ina, die immer für mich da ist.

Erklärung

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

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

Bayreuth, den 09.10.2002

Marc Ehnert

