

**Charakterisierung der *in vitro* Assemblierung
und Nukleinsäureinteraktion von
HIV Strukturproteinen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Mira Grättinger
aus Starnberg

- Hamburg 2000 -

meinen Eltern

I	Einleitung.....	3
I.1	Das humane Immundefizienzvirus - ein Vertreter der Retroviren.....	3
I.1.1	Die Genomorganisation von HIV.....	4
I.1.2	Der Replikationszyklus von HIV	6
I.2	Assemblierung der inneren Strukturproteine <i>in vitro</i>	9
I.2.1	HIV-CA und C-terminal verlängerte CA-Proteine	10
I.2.2	Die N-terminale Verlängerung von CA-Proteinen.....	11
I.3	Verpackung zellulärer Proteine in HIV-1	12
I.3.1	Das zelluläre Protein CyclophilinA	13
I.3.2	Die molekulare Interaktion von CypA mit der CA-Domäne von Gag	14
I.4	Das nukleinsäurebindende Protein NC	15
I.4.1	Die Rolle von NC bei der Verpackung viraler RNA	16
I.4.2	NC, ein Protein mit „Chaperon“-Aktivität gegenüber Nukleinsäuren.....	17
I.5	Fragestellungen.....	19
II	Material und Methoden.....	21
II.1	Allgemeines	21
II.2	Gentechnische Arbeiten.....	21
II.2.1	Materialien.....	21
II.2.2	Methoden	25
II.3	Proteinchemische Arbeiten	31
II.3.1	Materialien.....	31
II.3.2	Allgemeine Methoden.....	33
II.3.3	Proteinexpression und –reinigung	35
II.3.4	<i>In vitro</i> Selbstassoziation von HIV Gag-abgeleiteten Proteinen.....	41
II.4	Elektronenmikroskopische (EM) Methoden.....	42
II.4.1	Negativfärbung der <i>in vitro</i> assemblierten Partikel.....	42
II.4.2	Ultradünnschnitt EM induzierter <i>E.coli</i>	43
II.4.3	Cryo-EM und Bildverarbeitung	43
II.5	Spektroskopische Methoden.....	44
II.5.1	UV-Absorptionsspektroskopie	44
II.5.2	Fluoreszenzspektroskopie	46
II.5.3	Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie.....	50
II.5.4	Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) Spektroskopie.....	51
II.5.5	Dynamische Lichtstreuung	51
II.5.6	Isothermale titrationskalorimetrische (ITC) Messungen.....	52
III	Ergebnisse.....	55
III.1	<i>In vitro</i> Assembly Eigenschaften von HIV wildtyp (WT)-CA und CA-Varianten mit reduzierter Affinität gegenüber CypA	55
III.1.1	Herstellung und Analyse von CA Varianten mit reduzierter Affinität gegenüber CypA.....	55
III.1.2	<i>In vitro</i> Assemblierung der verschiedenen CA Proteine	60
III.1.3	Einfluß von CypA auf das <i>in vitro</i> Assembly von CA Proteinen.....	63
III.1.4	Cryo-Elektronenmikroskopischer Vergleich von CA-Zylindern mit und ohne CypA	66

III.1.5	Effekt von CypA auf bereits gebildete CA-Zylinder	69
III.2	Strukturbildungseigenschaften von HIV-1 und HIV-2 CA-NC	71
III.2.1	<i>In vitro</i> Assembly der gereinigten CA-NC Proteine	71
III.2.2	Untersuchung der Strukturbildung induzierter CA und CA-NC Proteine innerhalb von <i>E.coli</i>	74
III.3	<i>In vitro</i> Eigenschaften des Δ MA-CA-NC-SP2 Proteins	75
III.3.1	Spektroskopische Untersuchungen zur Konformationsstabilität von Δ MA-CA-NC-SP2 über einen weiten pH-Bereich.....	77
III.3.2	Einfluß der Strukturbildung auf die intrinsische Fluoreszenz von Δ MA-CA-NC-SP2	80
III.3.3	Etablierung eines <i>in vitro</i> Verdünnungs-Systems für die Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2.....	81
III.3.4	Zeitlicher Verlauf der Δ MA-CA-NC-SP2 Assemblierung	85
III.3.5	Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad von Δ MA-CA-NC-SP2 mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung	87
III.4	Analyse der Protein-Nukleinsäure Interaktion Gag-abgeleiteter Proteine....	90
III.4.1	Expression und Reinigung von CA146NC, NC und NC-SP2.....	90
III.4.2	Tryptophanfluoreszenz-Messungen Gag abgeleiteter Proteine.....	92
III.4.3	FRET-Titration eines dansylierten Oligonukleotids.....	100
III.4.4	Isothermale Titrationskalorimetrie Gag abgeleiteter Proteine	106
IV	Diskussion.....	109
IV.1	CypA übt <i>in vitro</i> durch direkte Bindung an CA einen „Chaperon“-artigen Einfluß auf dessen Multimerisierungseigenschaften aus	109
IV.2	HIV-2 CA-NC bildet weder <i>in vitro</i> noch innerhalb induzierter Bakterien geordnete Strukturen.....	114
IV.3	Kleine pH-abhängige Konformationsänderungen von Δ MA-CA-NC-SP2 korrelieren mit den zwei Assemblierungsphänotypen des Proteins	116
IV.4	Das Verdünnungs-System für die Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2 ermöglicht die zeitliche Verfolgung der Reaktion.....	118
IV.5	Δ MA-CA-NC-SP2 bindet wie NC spezifisch an das RNA-SL3, zeigt jedoch verminderte Affinität gegenüber Nukleinsäuren mit mehr als einer Bindungsstelle	119
IV.6	Anwendungsmöglichkeiten der beschriebenen Systeme.....	129
V	Zusammenfassung	131
VI	Literaturverzeichnis	135
VII	Anhang	145
VII.1	Primer	145
VII.2	Plasmide	146
VII.3	Abkürzungen.....	146
VII.4	Aminosäuren.....	151

I Einleitung

I.1 Das humane Immundefizienzvirus - ein Vertreter der Retroviren

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) ist der Erreger des erworbenen Immundefizienz Syndroms, AIDS („acquired immune deficiency syndrom“) und seit seiner Entdeckung vor 17 Jahren (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984) Objekt intensiver Forschung. Seitdem hat man viel über den Infektionsweg und die virale Replikation von HIV gelernt. Trotzdem starben alleine im Jahr 2000 weltweit ca. 3 Millionen Menschen an AIDS. Um neue Wege für die antivirale Therapie zu ermöglichen, ist es nötig, unser Wissen grundlegend zu erweitern.

HIV gehört zu der großen und vielfältigen Familie der Retroviren. Retroviren sind membranumhüllte Viren, deren Genom aus zwei Kopien einer einzelsträngigen Plus-Strang RNA besteht (Coffin *et al.*, 1997). Sie besitzen die außergewöhnliche Eigenschaft sich trotz ihres RNA-Genoms über DNA-Zwischenstufen zu vermehren. Dazu wird die virale RNA durch eine viruskodierte Polymerase (Reverse Transkriptase) in eine lineare doppelsträngige DNA revers transkribiert. Diese wird dann als Provirus in das Genom der infizierten Zelle integriert. In Umkehr des zentralen Dogmas der Biologie fließt bei den Retroviren die genetische Information also von der RNA zur DNA, was dieser Virenfamilie auch ihren Namen („Retro“) verlieh.

Generell können Retroviren, basierend auf ihrer Genomorganisation, in zwei Gruppen eingeteilt werden: die einfachen und die komplexen Retroviren. So enthalten alle Retroviren mindestens drei offene Leserahmen, *gag*, *pol* und *env*, die für die inneren Strukturproteine (Gag), die viralen Enzyme (Pol) und die Glykoproteine (Env) kodieren. Komplexe Retroviren, denen auch HIV zuzuordnen ist, tragen zusätzlich die Information für regulatorische Proteine. Die Glykoproteine sind in die äußere Lipidhülle inseriert, und das Genom ist nochmals von einer inneren Proteinhülle, dem Kapsid, umgeben. Die Form des Kapsids ist für die verschiedenen Vertreter dieser Familie charakteristisch.

Ursprünglich wurden Retroviren auf der Basis ihrer entsprechenden Kapsidmorphologien und der Art ihrer Partikelsynthese klassifiziert: B- und D-Typ Retroviren lagern sich bereits im Zytoplasma zu sphärischen Partikeln zusammen, hingegen entsteht bei den C-Typ Retroviren die sphärische Anordnung erst an der Zytoplasmamembran, während der Virusknospung.

Vor dem Hintergrund ihrer evolutionären Entwicklung werden Retroviren mittlerweile in sieben Gruppen unterteilt (Tab. I.1). Fünf dieser Gruppen repräsentieren Viren mit

onkogenem Potential, sie wurden früher auch als RNA-Tumoviren bezeichnet. Die beiden übrigen Gruppen sind die Lenti- und Spumaviren.

Gruppe	Vertreter	Morphologie	Genom
1. Aviäre Sarkom und Leukosis Gruppe	Rous Sarkom Virus (RSV)	C-Typ: Zentrales, sphärisches Kapsid	Einfach
2. Mammalian B-Typ Gruppe	Mouse Mammary Tumovirus (MMTV)	B-Typ: Exzentrisches, sphärisches Kapsid	Einfach
3. Murine Leukämie Gruppe	Moloney Murines Leukämievirus (MoMLV)	C-Typ: Zentrales, sphärisches Kapsid	Einfach
4. Humane T-Zell und bovine Leukämie Gruppe	Humanes T-Zell Leukämievirus (HTLV) Bovines Leukämievirus (BLV)	Zentrales, sphärisches Kapsid	Komplex
5. D-Typ Gruppe	Mason-Pfizer Affenvirus (MPMV)	D-Typ: Zylindrisches Kapsid	Einfach
6. Lentiviren	Humanes Immundefizienzvirus (HIV) Simianes Immundefizienzvirus (SIV)	C-Typ: Konusförmiges Kapsid	Komplex
7. Spumaviren	Humanes Foamyvirus (HFV)	Zentrales, sphärisches Kapsid	Komplex

Tab. I.1: Klassifikation der Retroviren. (Coffin *et al.*, 1997).

Die Entdeckung humaner Retroviren, allen voran das Lentivirus HIV, veränderte den Schwerpunkt retrovirologischer Forschung. Dies war nicht zuletzt in der durch die Ausbreitung von HIV ausgelösten AIDS Epidemie begründet. Inzwischen differenziert man zwischen zwei Typen, HIV-1 und HIV-2, welche wiederum in evolutionäre Subtypen unterteilt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte des Replikationszyklus von HIV untersucht. Daher wird in den folgenden Kapiteln die Organisation retroviraler Genome und der Ablauf des retroviralen Replikationszyklus anhand von HIV näher erläutert.

I.1.1 Die Genomorganisation von HIV

Im Gegensatz zu den einfachen Retroviren, deren Genom nur aus den drei offenen Leserahmen (ORF) *gag*, *pol* und *env* aufgebaut ist, enthält das Genom von HIV, einem komplexen Retrovirus, insgesamt neun ORFs (Coffin *et al.*, 1997) (Abb. I.1). *gag* kodiert für das gruppenspezifische Antigen Gag, ein 55 kD Polyprotein, das die inneren Strukturproteine Matrix (MA), Capsid (CA), Nukleokapsid (NC) und p6 umfaßt. Die enzymatischen Aktivitäten von HIV sind in dem ORF *pol* enthalten, der für die Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) kodiert. Dieser Leserahmen überlappt mit dem von *gag*. Die *pol*-Gene werden durch einen Leserahmenwechsel („frameshift“) exprimiert, der bei ca. 5% der Gag-

Transkripte zur Produktion des Gag-Pol Fusionsproteins führt (Jacks, 1990). Die Glykoproteine der Virushülle werden von dem ORF *env* kodiert und als Vorstufenprotein Env (gp160) synthetisiert, das sich aus den Proteinen TM (Transmembranprotein; gp41) und SU (Oberflächenprotein; gp120) zusammensetzt. Wie das Protein Env werden alle zusätzlichen HIV-Proteine von gespleißten Transkripten synthetisiert: Tat, ein frühes Genprodukt, aktiviert die virale Transkription; Rev ermöglicht den Transport unvollständig oder nicht gespleißter viraler RNAs in das Zytoplasma; Nef steigert *in vivo* die virale Infektiosität und Pathogenität. Die Funktionen der restlichen akzessorischen Proteine, Vpu, Vpr und Vif sind noch nicht vollständig geklärt (Frankel & Young, 1998)

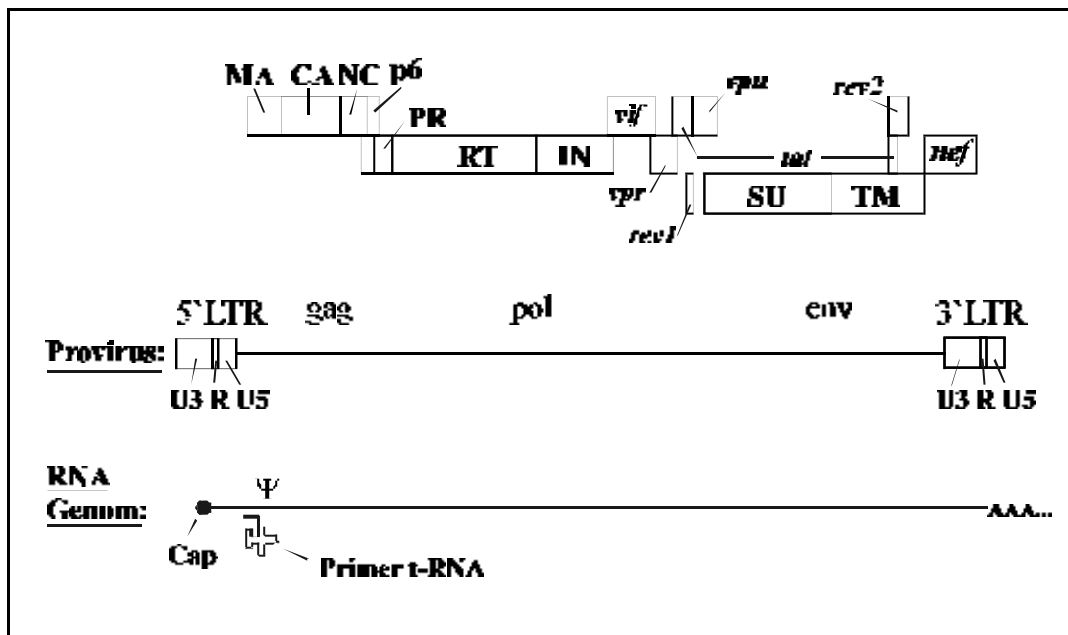


Abb. I.1: Genomorganisation von HIV-1. Die ORFs der viralen Proteine (Nomenklatur nach (Leis *et al.*, 1988)) sind oben gezeigt. MA: Matrix; CA: Capsid; NC: Nukleokapsid; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; IN: Integrase; TM: transmembranales Glykoprotein (gp41); SU: Oberflächen-Glykoprotein (gp120). Die akzessorischen Proteine sind kursiv dargestellt. Die provirale DNA und das RNA-Genom, sind im mittleren bzw. unteren Teil der Abbildung gezeigt.

Insgesamt hat das HIV-Genom eine Größe von ca. 9 kb und ist eingerahmt von den untranslatierten Regionen, dem 5'- und dem 3'LTR („long terminal repeat“). Durch die Transkription der integrierten proviralen DNA vom viralen LTR-Promotor entsteht die genomische RNA voller Länge (Abb. I.1). Diese erhält ein Cap an ihrem 5'Ende und wird am 3'Ende polyadenyliert. Die ungespleißte RNA dient als virales Genom sowie als mRNA der *gag* und *pol* Gene und als Ausgangsmaterial für alle gespleißten mRNAs. Neben den ORFs enthält das virale Genom einige *cis*-regulatorische Elemente. Dazu gehören die Zielsequenzen für die Proteine Tat und Rev (TAR, „Tat-responsive region“ bzw. RRE, „Rev response element“), das Signal (FS), das den Leserahmenwechsel zwischen *gag* und *pol* reguliert, eine Vielzahl von Spleißdonoren und -akzeptoren, die Bindestelle für die tRNA₃^{Lys} (PBS, „primer

binding site“), welche als Startermolekül bei der reversen Transkription fungiert, die Dimerisierungsstelle (DIS, „dimer initiation site“), eine palindromische Sequenz, von der die Dimerisierung der viralen RNA ausgeht, und das Verpackungssignal (ψ , ψ , „packaging signal“).

Das HIV-Verpackungssignal umfaßt einen Bereich von ca. 120 Basen und ist notwendig, um die Verpackung des RNA-Genoms über eine Interaktion mit der NC-Domäne von Gag zu gewährleisten (Aldovini & Young, 1990; Clavel & Orenstein, 1990; Lever *et al.*, 1989; Poznansky *et al.*, 1991). Die Sekundärstruktur des ψ -Elements wurde mit Hilfe von Mutagenisierungsstudien, chemischen und enzymatischen Zugänglichkeitsuntersuchungen („accessibility mapping“) und Berechnungen zur Minimierung der freien Energie bestimmt (Baudin *et al.*, 1993; Berkowitz & Goff, 1994; Berkowitz *et al.*, 1993; Clever *et al.*, 1995; Clever & Parslow, 1997; Clever *et al.*, 2000; Harrison & Lever, 1992; McBride & Panganiban, 1996; McBride & Panganiban, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1993). Es ist aus vier Haarnadelschleifenstrukturen („stem-loop“, SL1 bis SL4) aufgebaut und am 5'Ende des Genoms lokalisiert (Nukleotide 693 bis 809) (Clever *et al.*, 1995) (Abb. I.2). Die ψ -RNA Sequenz überlappt mit anderen *cis*-agierenden Elementen, nämlich der Dimerisierungsstelle und dem Hauptspleißdonor, die in den Haarnadelschleifenstrukturen SL1 bzw. SL2 enthalten sind. An seinem 3'Ende erstreckt sich das ψ -Element über das Startkodon von *gag* hinaus, welches sich noch vor dem SL4 befindet (Abb. I.2).

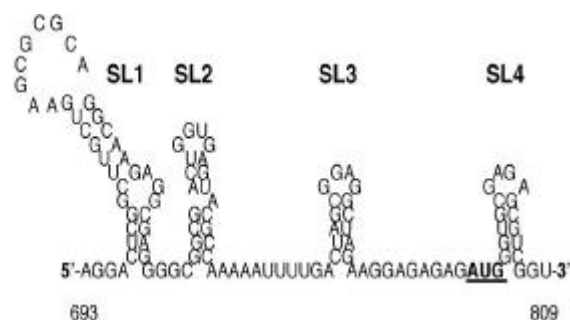


Abb. I.2: Nukleinsäuresequenz und Sekundärstruktur des HIV-1 Verpackungssignals (ψ). Die Nukleotidnummerierung entspricht der des HIV-1 Stamms NL4-3. Die Dimerisierungsstelle (DIS) und der Hauptspleißdonor (SD) sind in der Haarnadelstruktur SL1, bzw. SL2 lokalisiert. Das Gag-Startkodon ist hervorgehoben.

I.1.2 Der Replikationszyklus von HIV

(Coffin *et al.*, 1997; Frankel & Young, 1998; Kräusslich & Welker, 1996)

Eine Infektion mit HIV beginnt mit der Bindung des viralen Glykoproteins SU (gp120) an den CD4-Rezeptor der Zielzelle (z.B.: T-Helferzellen) (Klatzmann *et al.*, 1984) (Abb. I.1). Unter Mitwirkung eines Co-Rezeptors aus der Familie der

Chemokinrezeptoren (Deng *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996a) löst diese Interaktion eine Konformationsänderung in dem Oberflächenprotein TM (gp41) aus, wodurch ein Fusionspeptid exponiert wird. Dies führt zur Verschmelzung der viralen Membran mit der Plasmamembran der Zielzelle, gefolgt von der Freisetzung des Kapsids, welches das virale Genom enthält, in das Zytoplasma. Noch im Zytoplasma wird die virale RNA durch das virale Enzym Reverse Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Nach Dissoziation der Kapsidhülle formiert sich der Präintegrationskomplex (PIC), welcher in den Zellkern importiert wird. Die Zusammensetzung des PICs ist noch nicht genau definiert. Vermutlich besteht er aus dem viralen Genom in doppelsträngiger DNA Form, ein paar Molekülen Matrix (MA), RT, Integrase (IN), und Vpr. Die IN katalysiert dann die Integration der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle; es entsteht ein Provirus.

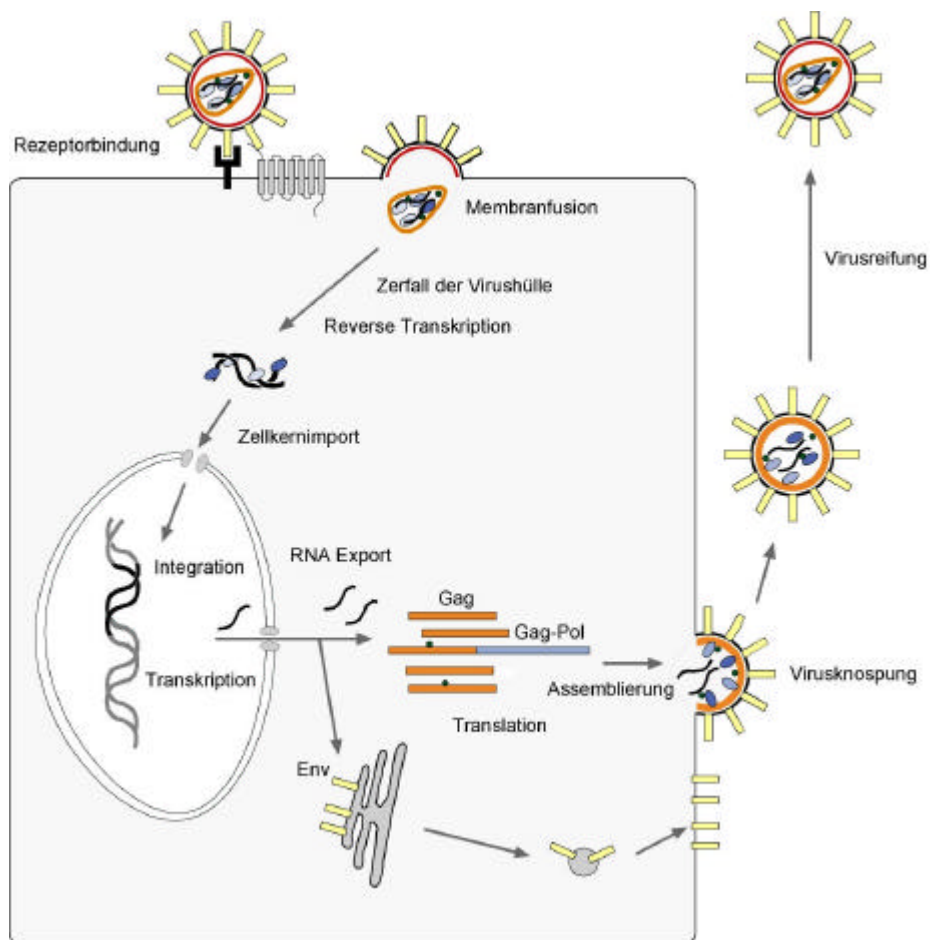


Abb. I.1: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV-1. Erklärung siehe Text.

Als obligater Zellparasit nutzt das Virus nun die zelluläre Maschinerie für seine Vermehrung. Durch die RNA Polymerase II wird unter der Kontrolle des im 5'LTR liegenden Promotors die virale Genexpression eingeleitet. In der frühen Phase werden die akzessorischen Proteine Tat, Rev und Nef exprimiert. Die Interaktion von Tat mit dem TAR-Element steigert wiederum die Transkription des viralen Genoms. Das virale Protein Rev transportiert unvollständig gespleißte virale mRNAs und

RNAs voller Länge in das Zytoplasma, wodurch die Translation der Gag- und Gag-Pol-Polypeptide ermöglicht wird. Env wird am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und gelangt nach Glykosylierung über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. Das Polyprotein der inneren Strukturproteine Gag wird an seinem N-terminalen Ende myristinyliert, an die Plasmamembran geleitet und in ihr verankert. Dort beginnen sich die Gag- und Gag-Pol-Polypeptide zu elektronendichten Strukturen zusammenzulagern. Gleichzeitig wird ein Dimer der genomischen RNA in das sich bildende Virion integriert. Dies geschieht über eine direkte Interaktion des Verpackungssignals (ψ -Element; siehe I.1.1) mit der nukleinsäurebindenden Domäne NC von Gag.

Auch zelluläre Proteine gelangen in das sich bildende Virion. Einige mit dem Zytoskelett assoziierte Proteine werden vermutlich zufällig in das Virion inkorporiert. Das zytoplasmatische Protein CypA gelangt jedoch über eine direkte Interaktion mit Gag an den Ort der Virusbildung. Der Einbau von CypA ist für die Infektiosität von HIV-1 essentiell. Allerdings ist der molekulare Mechanismus der CypA-Funktion noch nicht bekannt.

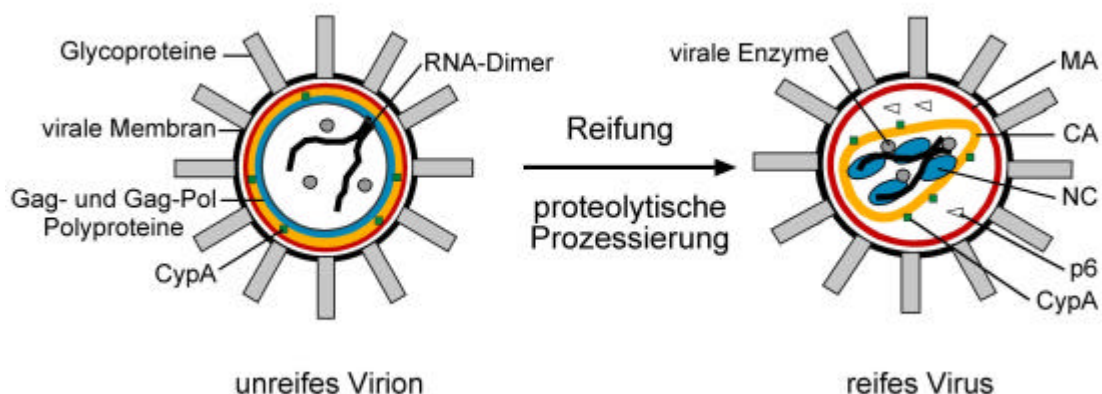


Abb. I.2: Schematische Gegenüberstellung eines unreifen bzw. reifen HIV-1 Partikels. Durch die proteolytische Prozessierung wird das Gag-Polypeptid in MA, CA, NC und p6 gespalten. Die örtliche Umlagerung der inneren Strukturproteine ist angezeigt.

Durch den Prozeß der Virusknospung wird das HIV-Partikel von der Plasmamembran mit den darin integrierten Glykoproteinen umhüllt und als unreifes Virion von der Zelloberfläche freigesetzt. Zu diesem Zeitpunkt sind die Gag-Polypeptide sphärisch zu einer elektronendichten Schicht direkt unterhalb der Membran angeordnet. Das Zentrum der Partikel erscheint hingegen leer. Die unreife Struktur wird durch Gag/Membran-, Gag/Gag- sowie Gag/Nukleinsäure-Interaktionen stabilisiert, die den einzelnen Domänen MA, CA, bzw. NC zugeordnet werden können.

Der virale Replikationszyklus wird durch die Reifung (Maturation) zu infektiösen Partikeln außerhalb der Zelle beendet. Dabei spaltet die virale Protease (PR) die Gag- und Gag-Pol-Polypoteine in ihre Bestandteile MA, CA, NC und p6, sowie PR, RT und IN. Diese proteolytische Prozessierung geht Hand in Hand mit der konformationellen und örtlichen Umlagerung der inneren Strukturproteine (Abb. I.2): MA bleibt auch im reifen Virus an der Membraninnenseite verankert. Im Gegensatz dazu kondensiert CA zu der inneren, konischen Proteinhülle, genannt Kapsid. Diese umgibt schützend den Nukleokapsidkomplex, bestehend aus NC und dem viralen RNA-Dimer, wobei NC auf eine Histon-ähnliche Weise mit der RNA interagiert. Die proteolytische Spaltung der Gag-Polypoteine führt also zu einer Kondensation in ein elektronendichtes, zentral liegendes Kapsid mit konusartiger Form.

Durch die Virusreifung wird die stabile, unreife Struktur (Assemblerungs-Modus) in die metastabile, reife Struktur umgewandelt, welche zur Dissoziation in einer neu infizierten Zelle bereit ist (Dissoziations-Modus).

I.2 Assemblierung der inneren Strukturproteine *in vitro*

In den letzten Jahren wurden *in vitro* Systeme entwickelt, die es erlauben, wesentliche Aspekte der retroviralen Assemblierung und Maturation gezielt zu untersuchen. Mit ihrer Hilfe kann der Aufbau der zwei unterscheidbaren Morphologien (unreif/reif) (Abb. I.2), die retrovirale Partikel im Verlauf des Replikationszyklus einnehmen, analysiert werden. Weiterhin kann darauf geschlossen werden, welche Gag-Domänen für deren Stabilisierung verantwortlich sind (Coffin *et al.*, 1997).

Prinzipiell können retrovirale Strukturproteine in den unterschiedlichsten zytoplasmatischen Regionen zu unreifen Partikeln assemblieren. Der Ort der Virusbildung wird durch den intrazellulären Transport der viralen Strukturproteine gesteuert. Ausschlaggebender Faktor für die Assemblierung ist dann eine ausreichende lokale Akkumulation der viralen Strukturproteine (Kräusslich & Welker, 1996).

Die HIV-1 Gag-Polypoteine konzentrieren sich unterhalb der Plasmamembran. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von Gag alleine ausreichend ist, um sphärische Partikel zu bilden, die morphologisch mit unreifen Virionen vergleichbar sind (Gheysen *et al.*, 1989). Ist die lokale Proteinkonzentration hoch genug, kann auch *in vitro* die Multimerisierung bakteriell exprimierter und gereinigter, retroviraler Strukturproteine induziert werden. Klikova *et al.* konnten 1995 zeigen, daß das gereinigte Vorläuferprotein Gag des Mason-Pfizer Affenvirus (M-PMV), einem D-Typ Retrovirus, *in vitro* zu sphärischen, kapsidähnlichen Strukturen assoziiert (Klikova *et*

al., 1995). Vergleichbare Strukturen wurden bereits in den Einschlußkörpern der *gag*-exprimierenden *E.coli*-Zellen gefunden. Ebenso konnte nach *in vitro* Transkription des M-PMV-Gag-Proteins vereinzelt dessen Assemblierung zu kapsidähnlichen Partikeln beobachtet werden (Sakalian *et al.*, 1996). Hingegen wurden tubuläre Strukturen nach *in vitro* Multimerisierung von bakteriell exprimierten, gereinigten Fragmenten des Rous-Sarkom-Virus (RSV) Gag-Polypeptides beobachtet (Campbell & Vogt, 1995). Dabei lagerte sich das RSV-Protein CA-NC bei leicht saurem pH-Wert, 100 mM NaCl und in Gegenwart von RNA zu hohlen Zylindern mit einem Durchmesser von 55 nm zusammen. Die Länge der Zylinder war abhängig von der Länge der RNA. Interpretation dieser Daten führte zu dem Modell, daß die Multimerisierung von Gag-Partikeln entlang von Nukleinsäuren initialisiert wird (Campbell & Vogt, 1995). Wurde das RSV-Protein um die in Gag N-terminal von CA-NC liegende Domäne p10 verlängert, bildeten sich sphärische Partikel nach *in vitro* Multimerisierung (Campbell & Vogt, 1997).

Gut charakterisiert ist auch die *in vitro* Multimerisierung von Gag-Proteinen aus HIV-1, auf die in den folgenden Kapiteln eingegangen wird.

1.2.1 HIV-CA und C-terminal verlängerte CA-Proteine

Das Gag-Polypeptid von HIV-1 ist aus den Domänen Matrix (MA), Capsid (CA), Nukleokapsid (NC) und p6 aufgebaut, wobei die Proteine CA und NC, sowie NC und p6 durch die kurzen Peptide SP1 und SP2 voneinander getrennt sind. In Arbeiten unserer und anderer Gruppen wurde die funktionale Beteiligung der einzelnen Domänen von Gag zur Bildung virusähnlicher Partikel *in vitro* untersucht (Campbell & Rein, 1999; Campbell & Vogt, 1995; Ehrlich *et al.*, 1992; Gross *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 2000; von Schwedler *et al.*, 1998).

Das kleinste zur Strukturbildung befähigte Protein war HIV-1 CA. Die Inkubation von bakteriell exprimiertem, gereinigtem CA bei neutralem bzw. leicht alkalischem pH-Wert sowie hoher Protein- (ca. 3 mg/ml, entspricht 125 µM) und Salzkonzentration (1 M NaCl) führte zur Bildung tubulärer Strukturen (Ehrlich *et al.*, 1992; Gross *et al.*, 1997) (Abb. 1.1). Diese waren innen hohl, von variabler Länge und hatten einen Durchmesser von ca. 55 nm sowie eine Wandstärke von ca. 6 nm (Gross *et al.*, 1997). Damit sind sie in ihrer Morphologie mit konischen HIV-1 Kapsiden vergleichbar, die einen Durchmesser von 34-69 nm aufweisen (Welker *et al.*, 2000).

Die Verlängerung von CA um das C-terminal angrenzende Peptid SP1 hatte weder Einfluß auf die Morphologie noch auf die Effizienz der Bildung *in vitro* assemblierter

Produkte (Gross *et al.*, 1997). Auch nach zusätzlicher Fusion der Domänen NC und SP2 oder NC, SP2 und p6 blieb die Morphologie unverändert (Campbell & Vogt, 1995; Gross *et al.*, 1997). Die Anwesenheit der nukleinsäurebindenden NC-Domäne erlaubte eine effizientere Multimerisierung im Beisein von Nukleinsäuren. Bei Zugabe von RNA lagerten sich die C-terminal verlängerten CA-Proteine bei ca. 20fach niedrigerer Proteinkonzentration und physiologischen Salzbedingungen zusammen. Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß *in vitro* die CA-Domäne alleine zur Bildung tubulärer Strukturen befähigt ist, die mit den konusförmigen Kapsiden reifer Viren vergleichbar sind. Die nukleinsäurebindende Domäne NC ist in der Lage, den Prozeß durch Erhöhung der lokalen Proteinkonzentration entlang eines RNA-Moleküls zu initiieren und dessen Effizienz zu steigern (Gross *et al.*, 1997).

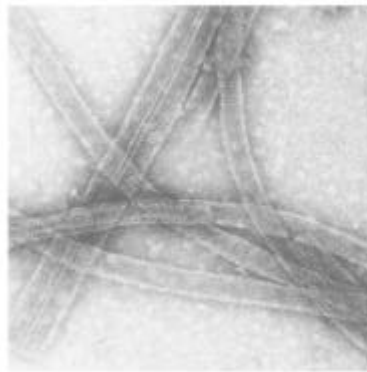


Abb. I.1: Produkte der *in vitro* Assemblierung von HIV-1 CA. 3mg/ml CA wurden über Nacht gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM DTT und 1 M NaCl dialysiert und nach Negativfärbung mit 2% Uranylacetat elektronenmikroskopisch analysiert. Die Zylinder haben einen Durchmesser von ca. 55 nm. (Gross *et al.*, 1998).

I.2.2 Die N-terminale Verlängerung von CA-Proteinen

Das HIV-1 CA Protein alleine sowie CA-Derivate, welche um die in Gag C-terminal daran angrenzenden Domänen SP1, NC, SP2 und p6 verlängert waren, assoziierten *in vitro* zu tubulären Strukturen, die in ihrer Morphologie mit reifen Kapsiden vergleichbar waren. Im Gegensatz dazu führten N-terminale Erweiterungen von CA zur Bildung sphärischer Partikel, entsprechend der im unreifen Virion vorherrschenden Anordnung der Strukturproteine (Gross *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 2000; von Schwedler *et al.*, 1998). Die N-terminale Fusion von vier Aminosäuren war ausreichend, um den Phänotyp der nach *in vitro* Multimerisierung entstehenden Partikel umzukehren (von Schwedler *et al.*, 1998). Analyse der dreidimensionalen Struktur der N-terminalen Domäne von CA lieferte eine einleuchtende Erklärung für die Rolle N-terminaler CA-Sequenzen während der Assemblierung (Gitti *et al.*, 1996). Im proteolytisch prozessierten CA Protein bilden die ersten 13 Aminosäuren eine β -Haarnadelschleife, welche durch eine Salzbrücke zwischen der N-terminalen NH_3^+ -

Gruppe des Pro1 und Asp51 stabilisiert wird. Durch diese Rückfaltung des CA N-Terminus könnte wiederum eine CA/CA-Kontaktfläche entstehen, welche für die Stabilisierung der konischen (*in vivo*), oder tubulären Struktur (*in vitro*) nötig ist. Allerdings war *in vitro* auch ein um 13 Aminosäuren verkürztes CA Protein dazu in der Lage, tubuläre Strukturen auszubilden (Gross *et al.*, 1998). Die Faltung der β -Haarnadelschleife ist also *in vitro* nicht unbedingt erforderlich, *in vivo* könnte sie aber als eine Art „molekularer Schalter“ während der Virusreifung fungieren.

Auch die Verlängerung um mehr als vier Aminosäuren resultierte in der Bildung sphärischer Partikel (Gross *et al.*, 1998). Insgesamt waren jedoch alle hergestellten Sphären in ihren Durchmessern kleiner und heterogener, als dies für unreife Virionen beobachtet wurde. Die einheitlichste Population mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 60 nm lieferte das Protein Δ MA-CA. Es enthält eine Deletion der Aminosäuren 16 bis 99 in MA, wodurch der globuläre Teil dieser Domäne entfernt ist. Im Kontext eines infektiösen proviralen Klon verändert diese Deletion nur den Ort der Virusknospung, nicht aber die Morphologie der entstehenden Virionen (Fäcke *et al.*, 1993).

Durch Kombination N- und C-terminaler Verlängerung entsteht das Protein Δ MA-CA-NC-SP2, welches sich vom Gag-Polypotein durch das Fehlen der Aminosäuren 16-99 aus MA und der C-terminalen p6-Domäne unterscheidet. Dieses Protein assembliert zu sphärischen Partikeln mit extrem großer Ähnlichkeit zu unreifen HIV-1 Partikeln in Form, Größe und innerer Organisation (Gross *et al.*, 2000). Das Protein Δ MA-CA-NC-SP2 ist aber in Abhängigkeit vom pH-Wert auch dazu in der Lage, tubuläre Partikel auszubilden und liefert damit ein System zur Charakterisierung der während der Maturation ablaufenden Vorgänge.

I.3 Verpackung zellulärer Proteine in HIV-1

Die Assemblierung retroviraler Partikel findet im Zytoplasma der infizierten Zelle statt. So ist es prinzipiell möglich, daß zelluläre Proteine die Virusbildung oder nachgeschaltete Prozesse beeinflussen. Daher wird versucht, diejenigen zellulären Proteine zu identifizieren, die mit viralen Bestandteilen assoziiert sind und auf diesem Weg in das virale Lumen gelangen.

Neben dem zytoplasmatischen Protein Cyclophilin A (CypA) wurden kürzlich eine Reihe weiterer Proteine zellulären Ursprungs im Inneren von HIV-1 entdeckt. Diese Proteine, deren Bedeutung für HIV nicht geklärt ist, sind entweder Bestandteil des Zytoskeletts, wie z.B. Actin, oder liegen mit dem Zytoskelett oder der Plasmamembran assoziiert vor (Ott *et al.*, 2000; Ott *et al.*, 1996). Ob das Zytoskelett in Prozessen der Virusbildung und Knospung eine Funktion ausübt, ist noch nicht

geklärt. Bisher konnte auch nicht differenziert werden, ob die Verpackung dieser Proteine zufällig geschieht, oder auf einer spezifischen Interaktion mit viralen Proteinen beruht. Das mit 200 Molekülen pro Virion vorliegende Actin konnte aber in den Viren in Assoziation mit NC lokalisiert werden (Wilk *et al.*, 1999).

Unumstritten ist, daß im Fall des Wirtsproteins CypA tatsächlich das Gag-Polypolypeptid für dessen Verpackung verantwortlich ist. Diese zytoplasmatische Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPlase) wird nur im Fall von HIV-1, nicht jedoch in HIV-2 oder SIV über eine direkte Bindung an die CA-Domäne von Gag inkorporiert (Franke *et al.*, 1994; Luban *et al.*, 1993; Thali *et al.*, 1994). CypA wird zu einem molaren Verhältnis von 1 Molekül CypA zu 10 Molekülen CA in das HIV-1 Partikel eingebaut. Der CypA-Einbau in das Virion kann durch das immunsuppressive Agens Cyclosporin A dosisabhängig blockiert werden, was wiederum mit einer bis zu 100fachen Abnahme der Infektiosität korreliert (Braaten *et al.*, 1996; Bukovsky *et al.*, 1997; Franke *et al.*, 1994; Thali *et al.*, 1994; Wiegers *et al.*, 1999). HIV-1 Partikel, die nicht die normalen Mengen an CypA enthalten, scheinen in einem Schritt kurz nach dem Eintritt in die Zielzelle, noch vor der reversen Transkription des Genoms blockiert zu sein (Braaten *et al.*, 1996). Der molekulare Mechanismus des CypA-Effekts ist bisher ungeklärt.

I.3.1 Das zelluläre Protein Cyclophilin A

Generell katalysieren PPlasen die *cis-trans*-Isomerisierung von Prolinpeptidbindungen. Das führt dazu, daß 15% dieser Bindungen in der sterisch weniger vorteilhaften *cis*-Konformation vorliegen. Die Prolinisomerisierung ist der limitierende Schritt bei der Faltung vieler Proteine *in vitro*, der durch die Anwesenheit von PPlasen beschleunigt werden kann (Schmid *et al.*, 1993). Insgesamt gibt es drei Proteinfamilien mit PPlase-Aktivität: Die Cyclosporin bindenden Cyclophiline, die FK506-bindende Proteinfamilie und die kleine prokaryotische PPlase Parvulin (Kay, 1996). Unter den sechs humanen Cyclophilinen steuert CypA den größten Anteil an zytoplasmatischer PPlase-Aktivität bei. CypA wird in allen untersuchten Zell- und Gewebstypen exprimiert und erreicht dort zwischen 0.1-0.4% der Gesamtproteinmasse (Fischer *et al.*, 1989; Harding *et al.*, 1986). Auf Grund der Tatsache, daß die Expression der Cyclophiline unter Streßbedingungen ansteigt, wurde ihnen zusätzlich eine „chaperonähnliche“-Funktion zugeschrieben (Kay, 1996; Luan *et al.*, 1994; Sykes *et al.*, 1993; Yount *et al.*, 1992). So könnten Cyclophiline neben ihrer PPlase-Funktion eine weitere Rolle bei der Faltung von Proteinen spielen, indem sie Nebenreaktionen auf dem Faltungsweg verhindern und Faltungszwischenstufen vor der Aggregation bewahren (Freeman *et al.*, 1996; Lilie *et al.*, 1993). CypA hat ein Molekulargewicht von 18 kD und ist aus zwei antiparallelen,

viersträngigen β -Faltblättern, die zusammen ein „ β -barrel“ bilden, aufgebaut. Die β -Faltblätter sind an beiden Seiten des „ β -barrels“ durch α -Helices und lange, exponierte oder kurze Schleifen verbunden. Cyclosporin und Substrate werden im aktiven Zentrum, einer langen Furche an der Außenseite des „ β -barrels“, gebunden (Kallen *et al.*, 1991; Ke *et al.*, 1994; Mikol *et al.*, 1993; Theriault *et al.*, 1993).

I.3.2 Die molekulare Interaktion von CypA mit der CA-Domäne von Gag

Das aktive Zentrum von CypA ist auch die für die spezifische Interaktion mit CA verantwortliche Region. CypA bindet an eine exponierte Schleife in der N-terminalen Domäne von CA. Die strukturelle Analyse von CypA/CA(1-151)-Kokristallen ergab, daß sich die CypA-Bindeschleife aus den Aminosäuren ⁸⁵Pro-Val-His-Ala-Gly-Pro-Ile-Ala-Pro⁹³ von CA zusammensetzt (Gamble *et al.*, 1996) (Abb. III.1). Basierend auf diesen Daten wurde für CypA eine sequenzspezifische Bindung an CA vorgeschlagen, bei der G89 und P90 tief im aktiven Zentrum von CypA verborgen sind. Ebenso konnte aus Mutationsstudien der CypA-Bindeschleife abgeleitet werden, daß G89 und P90 ausschlaggebende Faktoren für die Affinität von CypA zu CA darstellen (Yoo *et al.*, 1997). Die restlichen Aminosäuren tragen über ein kompliziertes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen zur Spezifität und Affinität der CypA/CA-Wechselwirkung bei. Ein Aminosäuresequenzvergleich der CA Proteine aus HIV-1 und HIV-2, welches kein CypA inkorporiert, ergab, daß auch in CA aus HIV-2 ein Gly-Pro-Dipeptid an vergleichbarer Position lokalisiert ist. Allerdings unterscheiden sich die das Gly-Pro umgebenden Aminosäuren, was wiederum darauf hindeutet, daß die gesamte Region um P90 für die Bindung eine wichtige Rolle spielt (Franke *et al.*, 1994).

Interessanterweise nimmt P90 im Komplex mit CypA eine *trans*-Konformation ein (Gamble *et al.*, 1996). In allen bisher untersuchten CypA/Peptid-Strukturen hingegen sind Proline in der *cis*-Konformation gebunden (Kallen *et al.*, 1991; Ke *et al.*, 1993; Zhao & Ke, 1996a; Zhao & Ke, 1996b). Auch G89 wurde eine wichtige Funktion in der spezifischen CypA-Bindung zugeschrieben, da die CypA-Bindeschleife nur durch das Fehlen eines großen Aminosäurerestes in dieser Position, die für die feste Bindung in der CypA-Bindetasche nötige Konformation einnehmen kann. In Einklang mit dieser Hypothese verringerte die Mutation von G89 zu Ala oder Val die Bindungsenergie um 2.0 bzw. 2.9 kcal/mol (Yoo *et al.*, 1997) und unterdrückte die Verpackung von CypA in HIV-1 Partikel sowie deren Infektiosität in Zellkultur (Braaten *et al.*, 1996; Franke *et al.*, 1994; Wiegers *et al.*, 1999).

Basierend auf der strukturellen Analyse von Kokristallen, welche stöchiometrische Mengen von CA(1-151) und CypA enthielten, wurde die Hypothese erstellt, daß CypA nicht für die Isomerisierung von P90 zuständig ist, sondern eher die Funktion

haben könnte, durch seine Bindung eine N-terminale CA/CA-Kontaktfläche zu blockieren (Gamble *et al.*, 1996). Dadurch könnten von dieser Oberflächenregion nicht die CA/CA-Wechselwirkungen eingegangen werden, welche für die Stabilisierung einer dreidimensionalen CA-Struktur nötig sind. Nach diesem Modell könnten die substöchiometrischen Mengen von CypA, die im Virion eingebaut werden, die Stabilität der Kapside vermindern, indem sie die CA/CA-Wechselwirkung in jeder zehnten dieser Kontaktflächen sterisch unterdrücken. Diese Destabilisierung der Kapside könnte nach Eintritt in die Zielzelle nötig sein, um dort ihr Auseinanderfallen und somit die Freisetzung des viralen Genoms ins Zytoplasma der infizierten Zelle zu gewährleisten. Blockiert man den Einbau von CypA in das Virion, müßte daher die Stabilität der Kapside zunehmen, gefolgt von einer verlangsamten oder fehlerhaften Genomfreisetzung. Dies wiederum könnte die Blockierung erklären, die vor der Replikation des Genoms beobachtet wurde, wenn die Verpackung von CypA durch die Zugabe von Cyclosporin unterdrückt wurde (Braaten *et al.*, 1996). Der Einfluß von CypA auf die Stabilität von Kapsiden wurde bisher jedoch noch nicht im Detail untersucht.

I.4 Das nukleinsäurebindende Protein NC

Die Interaktion mit Nukleinsäuren spielt bei der Assemblierung retroviraler Partikel eine große Rolle. Zwar ist das Protein CA dazu in der Lage, alleine tubuläre Strukturen *in vitro* zu bilden, die Effektivität dieses Prozesses kann aber durch die Verlängerung von CA um die nukleinsäurebindende Domäne NC in Anwesenheit von Nukleinsäuren gesteigert werden. Welche Rolle die NC/Nukleinsäure-Interaktion für die Assemblierung *in vivo* spielt, ist noch nicht vollständig geklärt. Aus Mutationsstudien konnte abgeleitet werden, daß in NC für die Assemblierung kritische Bereiche enthalten sind (Craven & Parent, 1996). Neben seiner Funktion während der viralen Assemblierung ist NC an mehreren weiteren Schritten des Replikationszyklus (siehe I.1.2) maßgeblich beteiligt (Darlix *et al.*, 1995). Grundlegend für die Funktionen von NC ist seine Fähigkeit mit Nukleinsäuren zu interagieren.

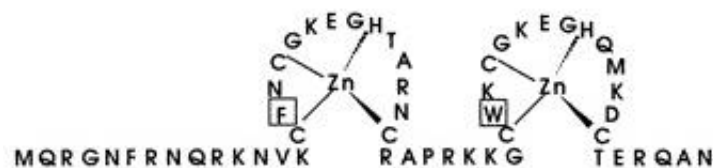


Abb. I.1: Aminosäuresequenz des NC-Proteins von HIV-1_{NL4-3}. Die Zink-Finger sowie die Zink-koordinierenden Aminosäuren sind angezeigt.

NC wird zunächst als Domäne des Gag-Polypeptids exprimiert. Durch proteolytische Spaltung entsteht das Protein NC in seiner reifen Form: Es ist ein sehr kleines und sehr basisches Protein (Rein *et al.*, 1998), welches aus nur 55 Aminosäuren aufgebaut ist. Auf Grund seines hohen Anteils an basischen Aminosäuren hat NC einen isoelektrischen Punkt (pI) von 10-11. Als strukturgebende Motive enthält es zwei starr gefaltete Zink (Zn)-Finger der Form $CX_2CX_4HX_4C$, die durch ein kurzes, flexibles Peptid aus sieben Aminosäuren miteinander verbunden und von kurzen N- und C-terminalen Sequenzen flankiert sind (Abb. I.1). *In vitro* bindet NC an einzelsträngige RNA, einzelsträngige DNA sowie doppelsträngige DNA. NC ist aber auch dazu in der Lage, sequenzspezifisch mit Nukleinsäuren zu interagieren. Diese Eigenschaft befähigt NC zu seiner wohl wichtigsten Aufgabe: Bevor NC durch die virale Protease von Gag abgespalten wird, ist es für die spezifische Verpackung des viralen Genoms verantwortlich.

I.4.1 Die Rolle von NC bei der Verpackung viraler RNA

Retrovirale Partikel enthalten eine Reihe verschiedener RNA Moleküle, davon entfällt jedoch ein Anteil von mehr als 50% auf das virale Genom. Das entspricht wiederum einer Anreicherung des Anteils der viralen RNA im Virion gegenüber dem Zytoplasma, wo es nur zu ca. 1% zum RNA-Gehalt beiträgt (Kräusslich & Welker, 1996). Die Verpackung des Genoms kann also kein zufälliger, diffusionsgesteuerter Prozess sein. Der Befund, daß Virus-ähnliche Partikel, die nur aus dem Gag-Polypeptid gebildet wurden, also weder Env noch Pol enthielten, ebenfalls virale RNA selektiv verpackten (Kaye & Lever, 1996; Oertle & Spahr, 1990; Sakalian *et al.*, 1994; Shields *et al.*, 1978), führte zu der Schlußfolgerung, daß in Gag die für die Verpackung notwendige Information enthalten sein muß. Mit Hilfe von genetischen Analysen konnte der für die Genomverpackung verantwortliche Bereich weiter eingegrenzt werden. So hatte die Deletion der Zn-Finger eine totale Blockade der Verpackung viraler RNA zur Folge (Meric *et al.*, 1988). Mit Hilfe von chimären Gag-Proteinen konnte die Bedeutung von NC für die spezifische Interaktion mit dem RNA-Genom weiter unter Beweis gestellt werden. Der Austausch der NC-Domäne des MoMLV (Moloney Murines Leukämievirus) mit der des HIV resultierte in einer fünffach verminderten Verpackungseffizienz des MoMLV-Genoms gegenüber einer vierfach gesteigerten Inkorporation des HIV-Genoms (Zhang & Barklis, 1995). Genauso führte der umgekehrte Austausch zur präferenziellen Verpackung des MoMLV-Genoms (Berkowitz *et al.*, 1995).

Die spezifische Verpackung des viralen Genoms wird also von der NC-Domäne als Teil von Gag bewerkstelligt. Dabei erkennt Gag das am 5'Ende des viralen Genoms lokalisierte Verpackungssignal (siehe I.1.1). Von besonderer Bedeutung ist dabei die

dritte Haarnadelstruktur (SL3). Sie alleine ist ausreichend, um heterologe RNA-Moleküle selektiv in das Virion zu schleusen (Hayashi *et al.*, 1992). Außerdem führt die Deletion dieses Bereichs zu einer 88%igen Reduktion der Verpackungseffizienz viraler RNA (Clever & Parslow, 1997). Die Analyse der NMR-Struktur des Komplexes aus NC und SL3 ergab, daß die beiden Zn-Finger für die spezifischen Kontakte mit den in der Schleifenregion exponierten Basen verantwortlich sind, wohingegen die basischen Aminosäuren des N-terminalen Bereichs von NC hauptsächlich elektrostatische Interaktionen mit dem Rückgrat der gepaarten Stammregion des SL3 eingeht (De Guzman *et al.*, 1998). Durch die Bindung nimmt dieser vormals kaum strukturierte N-terminale Bereich von NC die Konformation einer 3_{10} -Helix ein, welche tief in die große Furche des RNA-Stamms vordringt. Insgesamt wird die Interaktion unter physiologischen Bedingungen zu ca. 40% durch unspezifische, elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert und zu 60% durch hydrophobe, spezifische Wechselwirkungen (Mely *et al.*, 1995). Dabei tragen die Zn-Finger Domänen zu ca. 85% zur spezifischen, hydrophoben Stabilisierung bei (Urbaneja *et al.*, 2000).

Der N-terminale Bereich von NC ist also für die unspezifische Interaktion von NC mit Nukleinsäuren ausschlaggebend. Wechselwirkungen dieser Art müssen bei der Bildung des Nukleokapsidkomplexes nach proteolytischer Freisetzung von NC aus Gag überwiegen. Dabei bindet NC über die gesamte Länge an die genomische RNA und kondensiert diese in den kompakten, vor Nukleasen geschützten Komplex des reifen Virus (Lapadat-Tapolsky *et al.*, 1993; Sykora & Moelling, 1981; Tanchou *et al.*, 1995). Des weiteren besitzt NC auch „Chaperon“-Aktivität gegenüber Nukleinsäuren. Das heißt, NC katalysiert die Faltung von Nukleinsäuren in deren stabilste Konformationen, also in die Sekundärstruktur mit der größten Anzahl an Basenpaaren. Der molekulare Mechanismus dieser NC-Funktion ist nicht bekannt, allerdings sind dafür weniger die Zn-Finger, als die basischen Aminosäuren von Bedeutung (Rein *et al.*, 1998). Daraus läßt sich schließen, daß die „Chaperon“-Aktivität von NC auf der unspezifischen Interaktion mit Nukleinsäuren basiert.

I.4.2 NC, ein Protein mit „Chaperon“-Aktivität gegenüber Nukleinsäuren

Retrovirale NC-Proteine können konformationelle Umlagerungen von Nukleinsäuren sequenzunabhängig katalysieren (Darlix *et al.*, 1995; Rein *et al.*, 1998). Diese „Chaperon“-Aktivität von NC spielt an bestimmten Stellen des Replikationszyklus eine entscheidende Rolle.

Noch während der Assemblierung zu unreifen HIV Partikeln wird die zelluläre tRNA₃^{Lys} als Startermolekül für die spätere reverse Transkription an das virale Genom hybridisiert. Das 3'Ende (18 Basen) der tRNA₃^{Lys} ist komplementär zur am

5'Ende lokalisierten genomischen Bindestelle. Die Bildung dieses Komplexes erfordert das Aufbrechen der gefalteten tRNA-Struktur. Dieser Vorgang kann *in vitro* von NC katalysiert werden (Darlix *et al.*, 1995), und auch *in vivo* ist die NC-Domäne dafür notwendig (Huang *et al.*, 1998).

In retroviralen Partikeln liegt die RNA in Form eines Dimers vor. Die Dimerisierung geht von einer palindromischen Sequenz (DIS) aus, die sich im Fall von HIV-1 im SL1 des ψ -Elements befindet. Die 6 Basen der DIS zweier viraler RNAs bilden eine „kissing-loop“-Vorstufe, die unter Mithilfe von NC ausgeweitet und damit in das stabilere, reife Dimer überführt wird. Es konnte gezeigt werden, daß die Dimerisierung keine Voraussetzung für Genomerkennung oder Verpackung darstellt, da auch Viren, deren DIS zerstört war, normale Mengen an genomischer RNA enthielten (Clever & Parslow, 1997). Allerdings scheint *in vivo* erst die proteolytische Prozessierung von NC, die vollständige Dimerbildung auszulösen (Fu *et al.*, 1994; Fu & Rein, 1993).

Ferner wurde gezeigt, daß NC bei der reversen Transkription des Genoms assistiert. Dieser Vorgang spielt sich nach Infektion einer Zelle in deren Zytoplasma ab. NC verhindert das Pausieren der Reversen Transkriptase in den Bereichen der Matrizen-RNA, die Sekundärstrukturelemente enthalten (Rein *et al.*, 1998). Des weiteren fördert NC die Strang-Transfer-Ereignisse, die während des komplizierten Prozesses der reversen Transkription – vom einzelsträngigen RNA-Genom zum doppelsträngigen DNA-Genom – nötig sind.

Auch an der Bildung des Provirus könnte NC beteiligt sein. *In vitro* hatte die Anwesenheit von NC einen stimulierenden Effekt auf die von IN katalysierte Integration von Modellsubstraten (Carteau *et al.*, 1997).

Abgesehen von der Hybridisierung der tRNA₃^{Lys} an ihre Bindestelle (PBS) im RNA-Genom und den initialisierenden Schritten für die Dimerisierung der zwei genomischen RNA-Moleküle („kissing-loop“-Bildung), liegt NC bei allen anderen Nukleinsäure-„Chaperon“-Aktivitäten in seiner vollständig prozessierten Form vor. Im Gegensatz dazu wird die einzige NC-Funktion, die eine spezifische Nukleinsäureinteraktion erfordert – die Verpackung der genomischen RNA in das sich bildende Virion – von NC als Teil von Gag ausgeführt (siehe I.4.1).

I.5 Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Aspekte im Replikationszyklus von HIV-1 näher untersucht werden, an denen Gag oder seine Bestandteile beteiligt sind, nämlich die Assemblierung von Gag, seine Maturation, sowie seine Interaktion mit Nukleinsäuren und dem zellulären Faktor CypA. Dazu wurden gereinigte Gag-abgeleitete Proteine in *in vitro* Systemen eingesetzt, welche die detaillierte Betrachtung der den einzelnen Vorgängen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen erlauben.

Der Einfluß von CypA auf die Assemblierung von CA und die Stabilität der entstehenden kapsidähnlichen Strukturen *in vitro* sollte systematisch geklärt werden. Dazu sollten CA-Varianten hergestellt werden, welche in ihrer Affinität gegenüber CypA eingeschränkt sind. Diese sollten unter Zuhilfenahme des *in vitro* Systems zur Multimerisierung Gag-abgeleiteter Proteine mit wildtyp CA vergleichend analysiert werden. Aus den CypA-induzierten Effekten gegenüber den unterschiedlichen CA-Proteinen sollte ein Modell für dessen molekularen Mechanismus abgeleitet werden. Um den Prozess der Multimerisierung besser zu charakterisieren, sollte ein System etabliert werden, mit dessen Hilfe der zeitliche Verlauf der Reaktion verfolgt werden kann.

Des weiteren sollten die der Maturation von HIV-1 zugrunde liegenden konformationellen Veränderungen der Strukturproteine spektroskopisch analysiert werden. Ein Modellsystem hierfür stellt das Protein Δ MA-CA-NC-SP2 dar, welches je nach pH-Wert zu Strukturen multimerisiert, die der Anordnung von Gag im unreifen oder reifen Virus entsprechen (Gross *et al.*, 2000).

Der letzte Teil sollte sich mit der Frage auseinandersetzen, ob die proteolytische Prozessierung von NC mit den unterschiedlichen Funktionen korrelierbar ist, welche NC im Verlauf des viralen Replikationszyklus erfüllt. Bisher ist nicht geklärt, durch welchen Mechanismus Gag die für die Verpackung notwendige spezifische Interaktion gewährleistet, also selektiv das virale RNA-Genom aus dem Pool an zellulären RNAs erkennt und gleichzeitig die der NC-Domäne inhärente Eigenschaft, unspezifisch mit Nukleinsäuren in Wechselwirkung zu treten, unterdrückt. Diese Frage sollte durch gezielte Analyse der Nukleinsäurebindungseigenschaften verschiedener Gag-Spaltprodukte auf dem Weg zu vollständig prozessiertem NC adressiert werden.

II Material und Methoden

II.1 Allgemeines

Die meisten der verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden von folgenden Lieferanten bezogen: Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg i.Br.), Roth (Karlsruhe), Riedel de Haen (Seelze) und Roche (Mannheim).

Plastikwaren kamen von den Firmen: Greiner (Nürtingen), Becton-Dickinson (Heidelberg), Renner (Dannstadt) und Eppendorf (Hamburg).

Zur Herstellung von Puffern und anderen Lösungen wurde destilliertes Wasser aus einer Millipore Filtrationsanlage verwendet (MilliQ). Die pH-Werte der Lösungen wurden bei Raumtemperatur eingestellt, mit Ausnahme der für die Proteinreinigung verwendeten Puffer (4°C). Puffer für Chromatographie und Spektroskopie wurden filtriert.

Es wurden Röntgenfilme X-OMAT AR von Kodak verwendet.

II.2 Gentechnische Arbeiten

Alle Arbeiten mit DNA wurden nach allgemein üblichen Verfahren (Sambrook *et al.*, 1989) in entsprechend zugelassenen Labors durchgeführt. Bei der Kultivierung von Bakterien und bei gentechnischen Methoden wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Zur besseren Standardisierung einiger gentechnischer Arbeiten wurden kommerziell erhältliche, gebrauchsfertige Kits verwendet.

II.2.1 Materialien

II.2.1.1 Wichtige Chemikalien, Lösungen, Puffer, Enzyme, Standards und Kits

EDTA, 0.5 M, pH8.0

Ethanol absolut (nicht vergällt)

Ethanol 70%

Ethidiumbromid 1 mg/ml

Harnstoff 8 M

Isopropanol 100%

Kalium Acetat 3 M, pH5.0

Natrium Acetat 3 M, pH5.2

NaCl 3 M

SDS 10%

Tris-HCl, 1 M, pH 8.0

TE Puffer: 10mM Tris-HCl, pH 8.0 und 0.5 mM EDTA

Phenollösung: TE-gesättigte Lösung mit 0.2% 8-Hydroxycholelin, äquilibriert mit Tris-Puffer auf pH 8.0. Lichtgeschützte Aufbewahrung bei 4°C.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Ph-Chl.): TE-gesättigte Mischung im Volumenverhältnis 24:24:1. Lichtgeschützte Aufbewahrung bei 4°C.

Chloroform/Isoamylalkohol (Chl-IAA): wassergesättigte Mischung im Volumenverhältnis 24:1. Lichtgeschützte Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

Lösungen für die Präparation von Plasmid DNA:

Lösung I: 25mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose

Lösung II: 1% SDS, 0.2 M NaOH

Lösung III: 3 M Kalium Acetat, pH 5.0

TE/RNase: TE mit 50 µg/ml RNase A.

50fach TAE Puffer: 2 M Tris-Base, 0.25 M Essigsäure, 0.05 M EDTA

10fach TBE Puffer: 0.089 M Tris-Base, 0.089 M Borsäure, 0.02 M EDTA

5fach DNA Ladepuffer für Agarosegele: 50% Glycerin, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.01% Brom-Phenolblau

Acrylamidstammlösung für Sequenzgele:

30% Acrylamid (w/v) / 1.5% Bisacrylamid (w/v) (entspricht 19:1)

Fixierlösung für Sequenzgele: 10% Methanol, 10% Essigsäure

Restriktionsenzyme, T4-DNA Ligase, T4-DNA Polymerase, Klenow Enzym, thermostabile DNA-Polymerasen, alkalische Phosphatase und RNase A wurden von folgenden Firmen bezogen: New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Roche Mannheim (Mannheim), Pharmacia (Freiburg i.Br.), Stratagene (Heidelberg), MBI-Fermentas (St.Leon-Roth) und Sigma (Deisenhofen). Die Aufbewahrung erfolgte grundsätzlich bei -20°C.

RNase A (Sigma, Deisenhofen): 10 mg/ml Lösung in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 und 2 mM EDTA. Erhitzen zur Inaktivierung der DNase Aktivität und Lagerung bei -20°C.

Jet-Sorb Gel Extraktions Kit (Genomed, Bad Oeyenhausen)

T7 Sequencing Kit (Pharmacia, Freiburg i.Br.), Aufbewahrung bei -20°C

1kb DNA-Molekulargewichtsmarker (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus)

100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus)

II.2.1.2 Medien und Reagenzien für die Arbeit mit Bakterien

Die Medien (Sambrook *et al.*, 1989) und alle Lösungen für die Arbeit mit Bakterien oder rekombinanter DNA wurden direkt nach der Herstellung durch Autoklavieren sterilisiert oder sterilfiltriert.

LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe Extrakt und 5 g/l NaCl.

LB-Platten: LB-Medium mit 1.5% Agar wurde nach dem Abkühlen in sterile 10 cm Kunststoff-Petrischalen gegossen und bei 4°C aufbewahrt.

Nach Bedarf wurde dem LB-Medium für Flüssigkulturen oder Agarplatten nach Erkalten 100 µg/ml Ampicillin (LB_{Amp}) zugesetzt.

SOB-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefe Extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl. Vor Gebrauch Zugabe von je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄.

TB Puffer: 10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6.7, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Ampicillin: 100mg/ml in Wasser, sterilfiltriert und bei –20°C aufbewahrt.

IPTG: 1 M in Wasser, sterilfiltriert und bei –20°C aufbewahrt.

II.2.1.3 Bakterienstämme und Plasmide

Für alle Klonierungsarbeiten wurde der *Escherichia coli* (*E.coli*) Stamm XL-1 Blue der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Dieser hat die folgenden Genotyp-Merkmale: hsdR17, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F', proAB, lac^ρZΔM15, Tn10,(Tet^r)] und zeichnet sich durch eine besonders niedrige Rekombinationsfrequenz und eine hohe Transformierbarkeit aus.

Für die rekombinante Expression von Proteinen wurde der *E.coli* Stamm BL21 (DE3) verwendet, welcher folgende Eigenschaften besitzt: *E.coli* B, F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B-m_B-), gal, (DE3). Des weiteren verfügt er über die, stabil im Genom integrierte, RNA Polymerase des Phagen T7 unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors (Studier & Moffatt, 1986).

Alle Plasmide sind von den prokaryotischen Expressionsvektoren pET11c (Novagen, Madison, WI, USA) (siehe VII.2) und dem von Yoo *et al.*, modifizierten pGEX2T (Pharmacia, Freiburg i.Br.) abgeleitet (Yoo *et al.*, 1997). Der Vektor pET11c trägt eine T7-Expressionskassette, pGEX2T einen tac-Promoter. Beide Vektoren kodieren außerdem für den lac-Repressor, der sowohl die Transkription des T7-RNA-Polymerase Gens, als auch die Transkription des Zielgens durch die *E.coli* RNA-Polymerase unterdrückt. Somit wird eine unerwünschte Basalexpression des rekombinanten Proteins unterbunden. Der Vektor pGEX2T wurde entworfen, um die Zielgene in Fusion mit der Glutathion S-Transferase (GST) exprimieren zu können. Mit Hilfe der innerhalb des Leserahmens eingeführten *Nde*I-Schnittstelle (Yoo *et al.*, 1997), konnten die schon im pET11c-Kontext existierenden Expressionskonstrukte über *Nde*I und *Bam*HI umklont werden. GST-Fusionsproteine können in einem einzigen Schritt, direkt aus bakteriellen Zellysaten über affinitätschromatographische Methoden gereinigt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten und zum Teil hergestellten Expressionsplasmide sind nachfolgend aufgelistet (Tab. II.1):

Plasmid	Insert (Expressionsprodukt)	Backbone	Kloniert über	Herkunft
pET-1CA-WT	CA(WT) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pET 11c	NdeI-BamHI	(Gross <i>et al.</i> , 1997)
pET-1CA-WT <i>SphI</i>	CA(WT) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pET 11c ohne <i>SphI</i>	NdeI-BamHI	
pET-1CA-G89L	CA(G89L) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pET-1CA-WT <i>SphI</i>	<i>SphI</i> -SpeI	
pET-1CA-G89F	CA(G89F) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pET-1CA-WT <i>SphI</i>	<i>SphI</i> -SpeI	
pET-1CA-G89W	CA(G89W) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pET-1CA-WT <i>SphI</i>	<i>SphI</i> -SpeI	
pET-1CA-G89C	CA(G89C) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pET-1CA-WT <i>SphI</i>	<i>SphI</i> -SpeI	
pGEX-1CA-WT	CA(WT) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pGEX2T mit <i>NdeI</i> (Yoo <i>et al.</i> , 1997)	NdeI-BamHI	
pGEX-1CA-G89L	CA(G89L) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pGEX2T mit <i>NdeI</i> (Yoo <i>et al.</i> , 1997)	NdeI-BamHI	
pGEX-1CA-G89F	CA(G89F) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pGEX2T mit <i>NdeI</i> (Yoo <i>et al.</i> , 1997)	NdeI-BamHI	
pGEX-1CA-G89W	CA(G89W) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pGEX2T mit <i>NdeI</i> (Yoo <i>et al.</i> , 1997)	NdeI-BamHI	
pGEX-1CA-G89C	CA(G89C) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pGEX2T mit <i>NdeI</i> (Yoo <i>et al.</i> , 1997)	NdeI-BamHI	
pET-2CA-WT	CA(WT) aus HIV-2 Klon ROD (Guyader <i>et al.</i> , 1987)	pET 11c	NdeI-BamHI	
pET-2CA-NC-WT	CANC(WT) aus HIV-2 Klon ROD (Guyader <i>et al.</i> , 1987)	pET-2CA-WT	BsrGI-BamHI	
pET-CA-NC	CANC-SP2(WT) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pET 11c	NdeI-BamHI	(Gross <i>et al.</i> , 1997)
pET-CypA	hu-cyclophilin A (Billich <i>et al.</i> , 1995)	pET 11c	NdeI-BamHI	
pET- Δ MA-CA-NC-SP2	MA mit Deletion der As 16-99 und CA-NC-SP2 aus HIV-1 (Fäcke <i>et al.</i> , 1993)	pET 11c	NdeI-BamHI	(Gross <i>et al.</i> , 2000)
pET-CA146NC	Ab As 146 von CA und NC aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pET 11c	NdeI-BamHI	Dr. B. Müller
pET-NC-Sp2	NC-SP2(WT) aus HIV-1 pNL4-3 (Adachi <i>et al.</i> , 1986)	pET 11c	NdeI-BamHI	Dr. B. Müller

Tab. II.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide.

II.2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligodesoxynukleotide wurden aus der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Schreiber am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (Hamburg), oder von der Firma Metabion (München) bezogen. Eine vollständige Auflistung der verwendeten Primer befindet sich im Anhang (siehe VII.1).

Ribonukleotide und markierte Oligodesoxynukleotide stammen von den Firmen Metabion (München) oder Interactiva (Ulm). Markierte Oligonukleotide waren mit ihrem 5'-Enden an das Fluorophor Dansylchlorid (5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonylchlorid) gekoppelt:

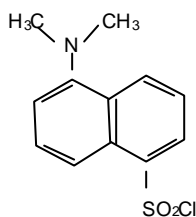


Abb. II.1: Strukturformel von Dansylchlorid.

II.2.2 Methoden

II.2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E.coli* Stämmen

Bakterien wuchsen entweder auf LB-Platten oder in LB-Flüssigmedium. Die Kultivierung transformierter Bakterien erfolgte immer in Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin. Für kleine DNA Präparationen („Mini-Preps“) wurden Röhrchen mit 5 ml LB-Amp aus einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Zur Großaufarbeitung von DNA wurden 200 ml LB-Amp in einem Erlenmeyerkolben inokuliert und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert.

Zur dauerhaften Kultivierung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer stationären Kultur mit 300 µl sterilem Glycerin (50%) versetzt und bei –80°C aufbewahrt.

II.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien (Inoue *et al.*, 1990)

In einem 2 l Erlenmeyerkolben wurden 250 ml SOB-Medium mit 2 ml einer *E.coli* XL-1 Übernachtskultur inokuliert und für ungefähr 24 Stunden bei 20°C kultiviert, bis eine OD₆₀₀ (optische Dichte) von 0.5 erreicht war. Danach wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, zentrifugiert und nach Waschen mit eiskaltem TB Puffer in 25 ml TB resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation der Bakterien auf Eis wurde Dimethylsulfoxid in einer Endkonzentration von 7% zugesetzt. Nach Aliquotieren in 100 – 500 µl wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –

80°C gelagert. Mit dieser Methode wurde eine Transformationskompetenz von bis zu 10^8 Kolonien pro μg Plasmid DNA erreicht.

II.2.2.3 Transformation von Bakterien

Nach dem Auftauen transformationskompetenter *E.coli* auf Eis wurden 100 μl Bakteriensuspension mit 10 μl DNA eines Ligationsansatzes oder mit 1 μl reiner Plasmid DNA vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 60 Sekunden einem Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad ausgesetzt, mit 800 μl LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert, um die Expression der Beta-Laktamase zu ermöglichen. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde der gesamte Ansatz auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

II.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli* erfolgte nach dem Verfahren der alkalischen Lyse.

Für die Gewinnung kleiner Mengen von Plasmid DNA („Mini-Preps“) wurden ca. 2 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in 2 ml Eppendorf-Gefäßen für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μl eiskalter Lösung I resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 200 μl Lösung II durch Invertieren gemischt. Anschließend wurden 150 μl Lösung III hinzugegeben, abermals invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wurde für 15 min in einer Mikrozentrifuge bei voller Drehzahl pelletiert, der Überstand in ein neues 1.5 ml Röhrchen transferiert, die DNA mit 270 μl Isopropanol (100%) präzipitiert und anschließend für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 800 μl 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde in 50 μl TE / RNase gelöst und konnte dann direkt für Restriktionsverdau (analytisch 2-8 μl , präparativ 10-40 μl), oder zum Sequenzieren (16 μl bzw. 3 μl) eingesetzt werden.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid DNA wurden 200 ml einer stationären Übernachtskultur von *E.coli* ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgearbeitet. Anschließend wurde die DNA-haltige Lösung auf Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) appliziert und gemäß den Angaben des Herstellers gewaschen und eluiert. Diese Vorgehensweise ergab 500-800 μg Plasmid DNA bei „high copy“ Plasmiden.

II.2.2.5 Alkoholpräzipitation von DNA

Zur Konzentrierung oder zum Pufferwechsel kann DNA mit Alkohol quantitativ präzipitiert und in einem neuen Puffer wieder aufgenommen werden.

Ethanolfällung: ein gegebenes Volumen der DNA enthaltenden Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 4.8 und mit 3 Volumina absolutem Ethanol versetzt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge für 15 bis 30 min bei voller Drehzahl und 4°C pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE gelöst.

Isopropanolfällung: ein gegebenes Volumen DNA wurde je nach Salzgehalt mit 0.6 bis 1.2 Volumina 100% Isopropanol vermischt, kurz bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert und, wie für die Ethanolpräzipitation beschrieben, weiterbehandelt.

II.2.2.6 Phenolextraktion

Unerwünschte Proteine können aus Lösungen mit DNA sehr effizient durch Extraktion mit Phenol entfernt werden. Dazu wurde die DNA auf ein Volumen von 200 bis 500 µl verdünnt und mit dem gleichen Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Dabei gehen die Proteine in die phenolische Phase, die durch anschließende Zentrifugation für 10 min in einer Mikrozentrifuge von der wässrigen Phase abgetrennt wurde. Nach Überführung der DNA in ein neues Röhrchen wurden Phenolreste durch zweifaches Ausschütteln mit Chloroform / Isoamylalkohol entfernt und die DNA mit Alkohol gefällt.

II.2.2.7 Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Spaltungen von Plasmid DNA mit Restriktionsenzymen wurden nach Angaben der Hersteller unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Das Volumen des zugesetzten Enzyms darf dabei 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Teilweise wurden die Restriktionsenzyme anschließend bei 65 oder 75°C für 20 min thermisch inaktiviert.

Ein diagnostischer Verdau wurde in der Regel mit 1-2 µg DNA (oder 4 µl Mini-Prep DNA) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Für präparative Zwecke wurden zwischen 2 und 20 µg DNA (oder 10 – 40 µl Mini-Prep DNA) in einem Volumen von 50 bis maximal 100 µl verdaut.

Für den Partialverdau mit *SphI* wurden 10 µg Plasmid-DNA mit ¾ Einheiten Enzym in 50 µl für 30 min bei 37°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt wurde.

II.2.2.8 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Eine nicht-denaturierende elektrophoretische Größenauftrennung von DNA Fragmenten erfolgte über 0.7-2% Agarose-Horizontal-Gele (w/v) mit 2 µg/ml Ethidiumbromid in TAE Puffer bei einer Spannung von 6 bis 8 Volt/cm. Vor dem

Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 0.2 Volumen Ladepuffer vermischt. Als Größenmarker wurde in der Regel mit *Hind*III und *Eco*RI verdauter Lambda-Phagen DNA oder kommerziell erhältliche Längenstandards verwendet. Die DNA Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator (254 nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis über eine Videokamera mit angeschlossenem Drucker (Intas, Göttingen) dokumentiert.

II.2.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten

Nach elektrophoretischer Trennung im Agarosegel wurden Gelstückchen mit den benötigten DNA Fragmenten bei langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten. Zur anschließenden Extraktion der DNA Fragmente aus dem Gelmaterial wurde der "Jet-Sorb" Kit der Firma Genomed nach Angaben des Herstellers benutzt. Prinzip: die Agarose wird in Gegenwart hoher Konzentrationen von chaotropen Salzen bei 50°C leicht geschmolzen. Unter diesen Bedingungen bindet die DNA an eine Silikatmatrix, welche von der Agarose abzentrifugiert werden kann. Anschließend wird die DNA in einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt (TE) von der Matrix eluiert.

II.2.2.10 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion („polymerase chain reaction“; PCR) dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen unter Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen sowie zweier Oligonukleotide als Startermoleküle („Primer“), die zu je einem kurzen Abschnitt der beiden Ursprungs-DNA-Stränge komplementär sind (Mullis *et al.*, 1986; Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985).

Die PCR wurde in einem 30-50 µl Ansatz in der Regel unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 200 nM dNTP's, 0.66 ng/µl Template DNA, je 2 µM Primer, 1 U Polymerase-Mix (Taq Polymerase und Pfu Polymerase 50:1). Puffer: 20 mM Tris HCl, pH 8.0, 25 mM KCl, 3 mM MgCl₂.

Da sich die Pfu Polymerase durch eine zusätzliche Korrekturlesefunktion auszeichnet, wurden PCR-Produkte mit einem Taq/Pfu Polymerase Gemisch, oder in seltenen Fällen nur mit Pfu Polymerase amplifiziert. Somit kann die Wahrscheinlichkeit PCR bedingter Mutationen minimiert werden. Für die Klonierung sowie für die Einführung von Mutationen in DNA Fragmente wurden die Primer mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen bzw. Nukleotidaustauschen versehen. Dabei wurde darauf geachtet, daß der an der Matrizen-DNA hybridisierende Teil von ausreichender Länge war (je nach GC-Gehalt > 18 Basen). Die Reaktion wurde je nach Primerkombination und Fragmentlänge in einem MJ-Research PTC200 Thermocycler mit Deckelheizung (Biozym, Oldenhausen) über 35 Zyklen durchgeführt. Die Abfolge der Hitzeschritte in einem Standardprotokoll waren wie

folgt: 11 Zyklen mit 20 s bei 94°C, 20 s bei 58°C, 30 s bei 72°C, gefolgt von 24 Zyklen mit 20 s bei 94°C, 20 s bei 68°C, 30 s bei 72°C.

Anschließend wurde das jeweils amplifizierte Fragment über ein Agarosegel gereinigt, nach Schneiden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einen Vektor kloniert und durch Sequenzieren überprüft.

II.2.2.11 Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase

Die Abspaltung von 5'-Phosphorsäuremonoester ist notwendig, um bei Ligasereaktionen eine intramolekulare Verknüpfung des Vektors zu verhindern. Dies geschieht besonders häufig, wenn der Vektor mit nur einem Enzym geschnitten wurde. Die Vektor DNA wurde in 200 µl Reaktionspuffer mit alkalischer Phosphatase (5 U/µg DNA) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 50°C inkubiert, um verborgene 5'-Enden dem Enzym zugänglich zu machen, danach mit frischem Enzym versetzt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch Phenolextraktion entfernt und die DNA durch Alkoholpräzipitation konzentriert.

II.2.2.12 Verdau von 3'-überhängenden Enden durch T4-DNA-Polymerase

Das Anfügen oder Entfernen von Nukleotiden kann notwendig sein, um die Ligation zweier nicht komplementärer DNA-Enden zu ermöglichen. Die T4-DNA-Polymerase verdaut 3'-überhängende Enden durch ihre 3' → 5'-Exonukleaseaktivität: Dadurch werden die Enden geglättet (Blunten). Die DNA (ca. 4 µg) wurde in einem Volumen von 20 µl in 1 x T4-DNA-Polymerase Puffer unter Zusatz von 0.3 mM dNTP's, 3 Einheiten T4-DNA-Polymerase und 250 µg/ml BSA für 30 min bei 37°C inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 75°C für 10 min schloß sich an. Auf diese Weise können unerwünschte Schnittstellen mit 3'-überhängenden Enden zerstört werden.

II.2.2.13 Faltung von Oligonukleotiden zu Haarnadelschleifen

Oligonukleotide mit zueinander komplementären Bereichen wurden in TE Puffer mit einer Endkonzentration von 100 µM gelöst. Bereits bestehende Basenpaarungen der Oligonukleotide wurden zunächst durch Erhitzen geschmolzen. Durch kontrolliertes Abkühlen kann dann die Faltung zur energetisch günstigsten Haarnadelstruktur stattfinden. DNA-Oligonukleotide wurden bei für 5 min bei 95°C, RNA-Oligonukleotide für 1.5 min bei 80°C in einem MJ-Research PTC200 Thermocycler mit Deckelheizung (Biozym, Oldenhausen) erhitzt und dann in 10°C-Schritten (DNA), oder auf Eis (RNA) abgekühlt.

II.2.2.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Vor jeder Ligrationsreaktion wurden die isolierten DNA Fragmente, die entweder kohäsive oder stumpfe Enden trugen, zur groben Quantifizierung nebeneinander im Agarosegel aufgetrennt. 5 bis 50 ng Vektor DNA wurden mit einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuß des DNA Fragments in einem Gesamtansatz von 20 µl mit 3 Einheiten T4 DNA Ligase versetzt und für mindestens 4 Stunden bei 16°C inkubiert. Als Kontrolle wurde immer eine zweite Ligation ohne Fragment angesetzt. Zur Transformation von kompetenten Bakterien wurden in der Regel 10 µl des Ligrationsansatzes verwendet.

II.2.2.15 Sequenzierung

Zum Sequenzieren wurde doppelsträngige Plasmid DNA verwendet. 2-2.5 µg DNA wurden mit 3 pmol Sequenzierprimer in einem Volumen von 20 µl gemischt. Zur Denaturierung wurden 3 µl einer 2 M NaOH, 2 mM EDTA Lösung hinzugefügt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Anschließend wurden 3 µl 2 M NH₄Ac (pH 4.5), 7 µl Wasser und 75 µl Ethanol (100%) hinzugefügt und für 20 min. inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Für die weiteren Schritte (nach der Methode von (Sanger *et al.*, 1977)) wurden die Reagenzien aus dem Sequenzierkit der Firma Pharmacia nach Angaben des Herstellers verwendet. Zum Nachweis der Sequenzierprodukte wurde α -³⁵S-dATP (spezifische Aktivität >1000 Ci/mmol) der Firma Hartmann (Braunschweig) eingebaut.

Zur Sequenzanalyse wurden die Sequenzierprodukte in 8%igen Polyacrylamidgelen (Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis: 19/1) mit 6 M Harnstoff aufgetrennt. Vor der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min bei 50 W vorgewärmt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 W in TBE Puffer. Anschließend wurden die Gele in Fixierlösung für 20 min eingeweicht und auf ein Filterpapier übertragen. Nach dem Trocknen der Gele bei 80°C in einem Vakuum-Geltrockner (BioRad, München) wurde zum Nachweis der Sequenzierprodukte ein Röntgenfilm exponiert.

Zum Sequenzieren wurde außerdem das Verfahren des AmpliTaq-BigDye PCR-Cyclesequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) angewendet. Dazu wurden 300-500 ng „Mini-Prep“ DNA mit 15 pmol Primer, 2 µl BigDye-Puffer und 6 µl Half-Term-Puffer, in einem Gesamtvolumen von 20 µl einer PCR mit 25 Zyklen unterzogen: 20 s bei 96°C, 11 s bei 50°C, 4 min bei 60°C. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und das trockene Pellet an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dietmar Richter im Zentrum für molekulare Neurobiologie

(ZMNH), Hamburg, übergeben. Dort wurde die Gelelektrophorese und Auswertung der Nukleotidsequenz durchgeführt.

II.3 Proteinchemische Arbeiten

II.3.1 Materialien

II.3.1.1 Wichtige Chemikalien, Lösungen, Puffer, Enzyme, Standards und Kits

Acrylamid 30%

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Ammoniumsulfat

1,4-Dithiothreitol (DTT), 1 M

Guanidiniumchlorid (GdmCl) 6 M

Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid (IPTG), 1 M

β -Mercaptoethanol

N,N'-Methylenbisacrylamid

Polyethylenglycol (PEG) 20000

Serva Blau R 250 (Coomassie-Blau-R)

SDS 10%

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Ponceau-S Rot: 0.1% Lösung (w/v) in 5% Essigsäure

MES, 1 M, pH 6.0

Tris-HCl, 1 M, pH 8.0

Tris-HCl, 1 M, pH 6.8

Chromatographische Materialien:

POROS HQ 20/M: Quaternäres Polyethyleneimine (PE Biosystems, Weiterstadt)

POROS HS 20/M: Sulfopropyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$) (PE Biosystems, Weiterstadt)

POROS HE 20/M: Heparin (PE Biosystems, Weiterstadt)

DEAE (DE52): Diethylaminoethyl Zellulose (Whatman, Maidstone, UK)

Phosphozellulose (Whatman, Maidstone, UK)

PBS Puffer: 1.48 g/l KH_2PO_4 , 3.27 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4/7\text{H}_2\text{O}$, pH 6.8, 7.5 g/l NaCl, 0.2 g/l

SDS-Laufpuffer für Proteingele: 0.384 M Glycin, 0.05 M Tris-Base, 0.1% SDS

5x SDS-Ladepuffer: 20% Glycerin, 5% SDS, 0.25 M DTT, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.01% Bromphenolblau, 5% β -Mercaptoethanol

Fixier- und Färbelösung für Proteingele (Fairbanks *et al.*, 1971):

Lösung A: 25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0.05% Coomassie-Blau-R

Lösung B: 10% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0.005% Coomassie-Blau-R

Lösung C: 10% Essigsäure, 0,002% Coomassie-Blau-R

Entfärbelösung für Proteingele: 10% Essigsäure

Western Blot Transferpuffer:

Puffer I: 0.3 M Tris, 20% MeOH

Puffer II: 0.025 M Tris, 20% MeOH

Puffer III: 0.025 M Tris, 20% MeOH, 0.04% Amino-n-Caprinsäure

Western Blot Blockierpuffer: 10% Magermilchpulver in PBS

Western Blot Waschpuffer: 0.5% Triton-X 100 in PBS

BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat) Lösung: 7.5 mg/ml

7.5 mg/ml in 100% Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C .

NBT (4-Nitrotetrazolium-Chlorid Blau) Lösung: 15 mg/ml

50 mg/ml in 70% Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C .

Western Blot Reaktionspuffer:

50 mM Glycin, pH 9.6 (mit NaOH eingestellt), 40 mM MgCl_2

Western Blot Entwicklerlösung:

100 μl BCIP Lösung, 35 μl NBT Lösung in 10 ml Äquibrierlösung

LMW-Marker (Low molecular weight) für SDS-Gelelektrophorese (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ, USA)

Bradford-Reagens (BioRad Protein Assay) (BioRad, München)

HIV-1 Protease (von Uwe Tessmer, Labor Prof. Dr. Kräusslich, zu Verfügung gestellt)

Phosphodiesterase (PDE) 2 mg/ml, aus *Crotalus durissus* (Roche, Mannheim)

Alkalische Phosphatase

II.3.1.2 Antikörper

In der folgenden Tabelle (Tab. II.1) sind alle verwendeten spezifischen Erst- und Zweitantikörper aufgeführt. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper für Western Blot (WB) und Nachweis mittels Alkalischer Phosphatase (AP) sind angegeben.

Spezifität	Herkunft/Spezies	Bezugsquelle	WB-Verdünnung
α -HIV-1 MA (p17)	Kaninchen	Prof. Dr. Kräusslich	1:250
α -HIV-1 CA (p24)	Kaninchen	Prof. Dr. Kräusslich	1:4000
α -HIV-2 CA (p24)	Kaninchen	Prof. Dr. Kräusslich	1:5000
α -HIV-1 NC (p7)	Kaninchen	Prof. Dr. Kräusslich	1:2000
α -Kaninchen; gekoppelte Alkalische Phosphatase	Ziege	Dianova, Hamburg	1:5000

Tab. II.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

II.3.2 Allgemeine Methoden

II.3.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteinanalyse wurde eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dabei werden Proteine auf Grund ihrer Größe aufgetrennt. Verwendet wurden 17.5% Trenngele mit einem Acrylamid(AA) zu Bisacrylamid(Bis)-Verhältnis von 200:1, oder 30:0.8 (für kleinere Proteine) und 5%ige Sammelgele (Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid: 40:1), welche in einem Mini-Gel-System (Größe 9x7x0.15 cm; System 201, Hoefer, San Francisco, USA) polymerisiert wurden. Die Lösungen für Sammel und Trenngele wurden wie in der folgenden Tabelle (Tab. II.1) zusammengestellt.

	17,5% Trenngele:		5% Sammelgel:
	200:1	30:0,8	
AA:Bis 200:1 (23.4% AA (w/v), 0.117% Bis (w/v))	15 ml		
AA:Bis 30:0.8 (30% AA (w/v), 0.8% Bis (w/v))		11.6 ml	
AA:Bis 40:1 (40% AA (w/v), 1% Bis (w/v))			1.25 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	5 ml	5 ml	
1 M Tris-HCl, pH 6.8			1.25 ml
10% SDS	200 µl	200 µl	100 µl
H ₂ O		3 ml	7.35 ml
10% APS	60 µl	200 µl	100 µl
TEMED	12 µl	8 µl	14 µl

Tab. II.1: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamidgele.

Die angegebenen Mengen reichten für jeweils 2 Gele der Größe 9x7x0.15 cm.

Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 bis 10 min zur vollständigen Denaturierung in Protein SDS-Ladepuffer gekocht. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei konstanter Stromstärke von zunächst 20 mA im Sammelgel, gefolgt von 40 mA im Trenngel. Nachdem die Farbfront das Gel durchlaufen hatte, wurde das Gel zum Nachweis der Proteine sukzessive für 2 min in den Fixier- und Färbelösungen A, B und C gekocht und je ca. 10 min abgekühlt. Der Hintergrund des gefärbte Gels wurde danach in Lösung D über Nacht auf einem Schwenker entfärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einer Videokamera mit angeschlossenen Drucker (Intas, Göttingen) fotografiert und zum Teil mittels eines Scanners digitalisiert.

II.3.2.2 Densitometrie

Die Reinheit von Proteinlösungen oder das stöchiometrische Verhältnis von Proteingemischen wurde durch densitometrisches Scannen von Coomassieblau gefärbten Gelen mit einem Desaga CD50 Densitometer bestimmt.

II.3.2.3 Immuno-Blot / Western-Blot (WB) Analyse (Towbin *et al.*, 1979)

Nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mit einer Semi-dry Trans-Blot Apparatur (cti GmbH, Idstein, Taunus) bei 0.8 mA pro cm² Gelfläche für 2 bis 3 h bei Raumtemperatur auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll, Dassel) übertragen. Dazu wurden in Transferpuffer I bis III getränkte Lagen Whatman-Papier, Gel und Membran zwischen Anode und Kathode wie folgt angeordnet: Anode → 2 Lagen Papier in Puffer I → 1 Lage Papier in Puffer II → Nitrozellulosemembran → SDS-Gel → 4 Lagen Papier in Puffer III → Kathode.

Die Übertragungseffizienz wurde durch Färbung mit Ponceau-S (Sigma) überprüft. Nach dem Entfärben mit PBS wurde die Nitrozellulose zur Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen für 1 h in Blockierpuffer inkubiert. Die spezifischen Antikörper wurden in PBS mit 1% Magermilchpulver und 0.5% Triton X-100 verdünnt und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Überkopf-Schüttler mit der Nitrozellulose inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Nitrozellulose mit Waschpuffer wurde die Membran erneut für 1 h blockiert. Die Inkubation mit dem an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Zweitantikörper erfolgte in PBS mit 2.5% Magermilchpulver und 0.5% Triton X-100 für 2 h. Danach wurde die Nitrozellulose intensiv mit PBS-Triton X-100 (0,5%) gewaschen. Auf einen weiteren Waschschrift mit Wasser folgte eine 5 minütige Äquilibrierung der Nitrozellulose in Reaktionspuffer. Die Membran wurde in die Entwicklerlösung überführt, woraufhin die Farbreaktion in 0.5 % SDS in ddH₂O gestoppt wurde.

II.3.2.4 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse ist eine Methode, um Proteinlösungen in ein neues Puffersystem zu überführen und gleichzeitig überschüssige, niedermolekulare Substanzen zu entfernen. Dazu wurden die zu dialysierenden Lösungen in Dialyseschläuchen mit Ausschlußgrößen von 3.5 kD oder 12-14 kD (SpectraPor, Laguna Hills, CA, USA), gegen ein mindestens 100-fach größeres Puffervolumen über mehrere Stunden gerührt. Um die Effizienz des Pufferaustausches zu erhöhen, wurde der Puffer mehrmals gewechselt.

II.3.2.5 Konzentrieren von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden entweder durch Ammoniumsulfatfällung (siehe II.3.3.2) oder Ultrafiltration eingeengt. Filtriert wurde gemäß den Angaben des Herstellers in einer Amicon Ultrafiltrationszelle (bis 50 ml), in Centricon-Röhrchen (bis 2 ml), oder Biomax-Röhrchen (bis 0.5 ml) (alles Millipore, Eschborn). Die verwendeten Filtrationsmembranen hatten Porenausschlußgrößen von 3.0 kD, 10.0 kD oder 5.0 kD.

II.3.3 Proteinexpression und –reinigung

Alle Schritte zur Proteinreinigung wurden grundsätzlich bei 4°C durchgeführt, außer denen der Perfusionschromatographie. Der Verlauf einer Proteinreinigung wurde durch Analyse der einzelnen Schritte mit Hilfe der SDS-PAGE, überprüft.

II.3.3.1 Zellanzucht, Induktion und Zellaufschluß

Nach Transformation von kompetenten *E.coli* BL21(DE3) mit den entsprechenden Proteinexpressionsplasmiden (siehe II.2.1.3) wurden sie auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden in 10 ml LB_{Amp}-Medium suspendiert und damit 1 l LB_{Amp}-Medium angeimpft. Das Medium wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.6 bei 37°C geschüttelt und dann die Proteinexpression durch Zugabe von 500 µM IPTG induziert. Nach Inkubation für weitere 4 h wurden die Bakterien in einem 4.2-Rotor (Beckman) bei 4500 rpm für 15 min zentrifugiert, die Pellets mit PBS gewaschen und bei –20°C gelagert, oder direkt als Ausgangsmaterial für die Proteinreinigung verwendet.

Zum Zellaufschluß wurden die Pellets aus 1 l Medium in 25-50 ml Lysepuffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde unter Kühlung mittels achtmaliger Ultraschallbehandlung für je 20 s lysiert. Zur Verwendung kam ein „B12 Sonifier“ Ultraschallgerät der Firma Branson (Danbury, CT, USA) bei Stärke 7. Das Zellysat wurde in einem JA 25.50-Rotor für 5 min bei 14000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde meist in der Hälfte des Ausgangsvolumen in Lysepuffer aufgenommen, erneut beschallt (4 mal) und für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Aufschluß-Überstände der beiden Zentrifugationen vereint.

II.3.3.2 Ammoniumsulfatfällung

In wäßrigen Lösungen besitzen Proteine eine Hydrathülle. Führt man hohe Konzentrationen an Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) einer Proteinlösung zu, entzieht das Salz den gelösten Proteinen ihre umgebende Hülle aus Wassermolekülen. Es bildet sich ein Proteinpräzipitat (Aussalzen). Dieses Phänomen kann man zur Konzentrierung von Proteinlösungen, oder zur Trennung von Proteinen aus einem

Gemisch nutzen, da unterschiedliche Proteine auf Grund ihrer jeweiligen Ladung und der Verteilung hydrophober Regionen auf ihrer Oberfläche bei unterschiedlichen Konzentrationen an Ammoniumsulfat ausfallen.

Ammoniumsulfat wurde den Proteinlösungen langsam (verteilt auf ca. 1 h) und unter Rühren bis zur entsprechenden Endkonzentration (w/v) bei 4°C zugeführt. Der gebildete Niederschlag wurde bei 12000 rpm für 10 min pelletiert (JA 25.50-Rotor) und konnte entweder bei 4°C gelagert, oder ebenfalls bei 4°C, unter mindestens 30 minütigem Rühren in den jeweiligen Puffern resuspendiert werden. Der verbleibende, unlösliche Anteil wurde durch Zentrifugation (14000 rpm, 5min, JA 25.50-Rotor) pelletiert und verworfen.

II.3.3.3 Allgemeine Chromatographische Methoden

Durch die Ionenaustausch Chromatographie werden Moleküle auf Grund ihrer Nettoladung getrennt. Bei der Anionenaustausch Chromatographie ist das Trägermaterial positiv geladen, somit können negativ geladene Biomoleküle abgetrennt werden. Bei der Kationenaustausch Chromatographie binden positiv geladenen Moleküle an die negative Säulenmatrix. Der isoelektrische Punkt des zu reinigenden Proteins ist entscheidend für die Auswahl des Ionenaustauschmaterials und für den während der Chromatographie vorherrschenden pH-Wert. Es können aber auch, wie bei der Affinitätschromatographie, spezifische Bindungseigenschaften der Proteine ausgenutzt werden.

In beiden Fällen können die adsorbierten Proteine durch Erhöhung der Ionenstärke, in Form von definierten NaCl-Stufen oder eines NaCl-Gradienten, von der Matrix eluiert werden.

Die chromatographischen Schritte wurden, falls nicht gesondert vermerkt, an einer BioCAD Sprint Perfusions Chromatographie-Anlage (PE Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

II.3.3.3.1 HQ-Anionenaustausch Chromatographie

Um Nukleinsäuren aus Zelllysaten quantitativ zu entfernen, wurde der in HQ-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) gelöste Anteil mit einer Laufgeschwindigkeit von 15 ml/min auf eine 10 ml HQ-Säule appliziert. Diese wurde zuvor mit mindestens 3 Säulenvolumina HQ-Puffer äquilibriert. Bei dem pH-Wert von 8.3 liegen die meisten Proteine in positiv geladener Form vor und befinden sich daher im Durchfluß. Die negativ geladenen Nukleinsäuren binden hingegen an die Säulenmatrix und werden im Anschluß mit einem 0.5 bis 1 M NaCl-Gradienten von der Säule gewaschen.

II.3.3.3.2 (DEAE)-Anionenaustausch Chromatographie

Auch mit Hilfe der DEAE-Zellulose (Diethylaminoethyl, Whatman DE52) können Nukleinsäuren und andere negativ geladene Moleküle aus Zellysaten entfernt werden. Sie wurde als „Batch Adsorption“ angewendet. Dazu wurden 3 g DEAE-Material pro 3 g Bakterienfeuchtmasse in 50 ml 1 M Tris, pH 8.0 über Nacht unter Rühren vorinkubiert. Nach Sedimentation wurde der Überstand abgegossen und das Material so lange in je 50 ml DEAE-Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) gewaschen, bis es auf pH 8.0 äquilibriert war. Zur Adsorption wurde das ebenfalls in DEAE-Puffer gelöste Proteingemisch mit einem Drittel der DEAE-Zellulose für 30 min auf einem Über-Kopf-Schüttler bei 4°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Dieser „Batch Vorgang“ wurde mit dem Überstand und der restlichen DEAE-Zellulose noch zwei weitere Male wiederholt. Das Zellulose-Material wurde mit 10 ml DEAE-Puffer sequentiell gewaschen. Überstand und Waschpuffer wurden vereint. Sie enthielten die CA Proteine.

Bei der Reinigung von CypA wurde der proteinhaltige Durchfluß einer DEAE-Sephrose CL-6B-Säule gesammelt, die mit 20 mM Tris-HCl, pH 7.8 äquilibriert war.

II.3.3.3.3 HS-Kationenaustausch Chromatographie

Die Chromatographie mit Hilfe der HS-Säule (Sulfopropyl) erfolgte immer in 30 mM MES, pH 6.0, 1 mM EDTA aber unterschiedlichen Mengen an DTT und NaCl. Eine 1.6 ml HS-Säule (Poros HS 20/M) wurde mit mindestens 6 Säulenvolumina äquilibriert und das jeweilige Proteingemisch mit 10 ml/min aufgepumpt. CA Proteine wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 0.5 M eluiert (über 10 Säulenvolumina), oder im Fall der G89-Varianten mit einer 0 bis 0.1 M NaCl-Stufe. Das Protein Δ MA-CA-NC-SP2 wurde durch eine Folge von NaCl-Stufen von der Säule eluiert (von 250 mM auf 500 mM, auf 750 mM und auf 1 M über je 4 Säulenvolumina). Im Fall von CypA wurde die HS-Säule mit einem 0 bis 0.8 M NaCl-Gradienten über 8 Säulenvolumina entwickelt.

II.3.3.3.4 (HE)-Affinitätschromatographie

Gegenüber Heparin (HE) zeigen hauptsächlich nukleinsäurebindende Proteine erhöhte Affinität. Ihre Wechselwirkung mit Heparin ist der natürlichen Protein/Nukleinsäure Interaktion sehr ähnlich.

Eine 1.6 ml HE-Säule wurde mit mindestens 6 Säulenvolumina HEPA-Puffer äquilibriert und das jeweilige Proteingemisch mit 10 ml/min aufgepumpt. Die gebundenen CA-NC-Proteine wurden mit einem 0.1 bis 0.8 M NaCl-Gradienten über 10 Säulenvolumina eluiert. Im Fall von CA146NC wurde die Probe mit 125 mM NaCl auf die Säule appliziert. Sie wurde dann mit einer Salzstufe auf 0.2 M NaCl gefolgt

von einem 0.2 bis 0.6 M NaCl-Gradienten über 12 Säulenvolumina entwickelt. Durch proteolytische Spaltung erzeugtes NC wurde mit einem 90 bis 450 mM NaCl-Gradienten (über 12 Säulenvolumina) und einer anschließenden NaCl-Stufe auf 600 mM, von seinem CA146-Anteil getrennt. Das Protein NC-SP2 wurde von den restlichen *E.coli* Proteinen durch eine Abfolge von NaCl-Stufen gereinigt (von 200 mM auf 330 mM über 4 Säulenvolumina, auf 400 mM über 6 Säulenvolumina, auf 500 mM über 4 Säulenvolumina, auf 600 mM über 4 Säulenvolumina, und auf 1 M über 3 Säulenvolumina).

II.3.3.3.5 Phosphozellulose (PC)-Affinitätschromatographie

Phosphozellulose wird in erster Linie für die Reinigung nukleinsäurebindender Proteine eingesetzt. Die an das Zellulosematerial gebundenen Phosphatgruppen ahmen das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat von Nukleinsäuren nach. Somit können die Proteine auf ähnliche Weise mit den Phosphatresten interagieren. Die PC wurde nach folgendem Protokoll äquilibriert und als „Batch Adsorption“ angewendet:

2 g PC wurden mit 50 ml 0.5 M NaOH vermischt und nach 4 min bei 1000 rpm in einem 4.2-Rotor (Beckman) für 30 s zentrifugiert. Daraufhin wurde die PC so lange mit Wasser gewaschen, bis ein pH von 11 erreicht war. Die selbe Behandlung wurde nun mit 0.5 M HCl durchgeführt. Bei einem pH von 3 wurde die PC mehrmals mit 10fach konzentriertem Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 7.5) inkubiert, um sie auf den gewünschten pH-Wert von 7.5 einzustellen. Danach wurde die PC mit dem jeweiligen PC-Puffer äquilibriert (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 10% Glycerol, 20 μ M ZnCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM DTT).

Das Proteinmaterial ausgehend von ca. 5 g Bakterienfeuchtmasse wurde auf 20 ml gepackte PC appliziert, für 30 min auf einem Über-Kopf-Schüttler bei 4°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die PC mit 3 mal 4 Säulenvolumina PC-Puffer (mit 400 mM NaCl) gewaschen. Das Zellulosematerial wurde in eine Tropfsäule überführt und die gebundenen Proteine mit 800 mM NaCl enthaltendem PC-Puffer eluiert. Es wurden ca. 5 ml große Fraktionen gesammelt, deren Proteingehalt mit dem Bradford-Test bestimmt wurde.

II.3.3.4 Lagerung gereinigter Proteine

Gereinigte Proteine wurden in ihren entsprechenden Lagerpuffern bei –80°C aufbewahrt.

II.3.3.5 Reinigung von CA Proteinen

Die Reinigung von CA Proteinen verlief größtenteils gemäß dem für HIV-1 CA publiziertem Protokoll (Gross *et al.*, 1997): CA exprimierende *E.coli* Zellen (ca. 4 g) wurden in 50 ml Lyse-Puffer (50 mM MES, pH 6.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) wie unter II.3.3.1 beschrieben aufgeschlossen. Der Zellschrott wurde durch sequentielle Zentrifugationsschritte (5000 rpm für 5 min, 15000 rpm für 10 min je in JA-25.50-Rotoren und 38000 rpm für 60 min in einem 50.2 TI-Rotor) entfernt. Die löslichen CA Proteine wurden durch Zugabe von 30% Ammoniumsulfat gefällt und in DEAE-Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 mM EDTA, 1 mM DTT) gelöst. Nukleinsäuren und ein Großteil der *E.coli* Proteine wurden in einem Batch-Verfahren mit DEAE-Zellulose abgetrennt. Der Überstand wurde gegen 30 mM MES, pH 6.0, 1 mM EDTA und 1 mM DTT dialysiert und einer HS-Kationenaustauscher Chromatographie unterzogen. Die CA enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit 50% Ammoniumsulfat gefällt und in Lagerpuffer (30 mM MES, pH 6.0, 1 mM EDTA und 1 mM DTT, oder 5 mM DTT im Fall von CA(G89C)) in ca. einem Zwanzigstel des Volumens resuspendiert.

II.3.3.6 Reinigung von CA-NC Proteinen

Der Zellaufschluß HIV-1 oder HIV-2 CA-NC exprimierender Bakterien (ca. 4 g) erfolgte in 50 ml Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl, 1 M LiCl, 1 µM ZnCl₂, 7% Glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT) wie in II.3.3.1 beschrieben. Nicht lösliche Zellbestandteile wurden bei 20000 rpm (JA 25.50-Rotor) für 10 min pelletiert und der Überstand einer 10%igen Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Das Pellet wurde in 40 ml HQ-Puffer gelöst und auf die HQ-Säule appliziert. Der Durchfluß wurde mit HEPA-Puffer (20 mM Tris-HCl, 1 µM ZnCl₂, 10% Glycerol, 5 mM DTT) auf eine Endkonzentration von 100 mM NaCl verdünnt und über eine HE-Säule wurde CA-NC von verunreinigenden Proteinen getrennt. CA-NC-haltige Fraktionen wurden vereint, gegen Lagerpuffer (50 mM Tris-HCl, 5 µM ZnCl₂, 0.5 M NaCl, 10% Glycerol, 2 mM DTT) dialysiert und in einer Amicon Ultrafiltrationszelle über einer YM3-Membran eingeeengt.

II.3.3.7 Reinigung von DMA-CA-NC-SP2

Das verwendete Reinigungsprotokoll entsprach im wesentlichen der von Gross *et al.*, publizierten Vorschrift (Gross *et al.*, 2000): 4 g ΔMA-CA-NC-SP2 exprimierende Zellen wurden in 50 ml, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 M LiCl, 1 mM EDTA und 5 mM DTT lysiert und die nicht löslichen Zellbestandteile pelletiert (siehe II.3.3.1). Der Zellextrakt wurde durch eine 25%ige Ammoniumsulfatfällung fraktioniert und der Niederschlag in 50 ml HQ-Puffer resuspendiert. Das gelöste Material wurde auf einer

HQ-Säule von Nukleinsäuren befreit und der proteinhaltige Durchfluß erneut mit 25% Ammoniumsulfat gefällt. Anschließend wurde das Pellet in HS-Puffer (30 mM MES, pH 6.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA und 2 mM DTT) gelöst und 1:1 mit HS-Puffer ohne NaCl auf eine Endkonzentration von 250 mM NaCl verdünnt. Das Proteingemisch wurde einer HS-Chromatographie unterzogen und die Δ MA-CA-NC-SP2-haltigen Fraktionen vereint. Diese wurden im Anschluß durch eine 50%ige Ammoniumsulfatfällung eingeeengt und in ca. 2 ml Lagerpuffer (30 mM MES, pH 6.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA und 2 mM DTT) resuspendiert.

II.3.3.8 Reinigung von NC-SP2 sowie Reinigung und proteolytische Spaltung von CA146NC

Nach der Lyse NC-SP2 exprimierender Zellen in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 μ M ZnCl₂ und 5 mM DTT (siehe II.3.3.1) wurde der lösliche Zellanteil mit 45% Ammoniumsulfat gefällt. Das Pellet wurde in HQ-Puffer aufgenommen und auf eine HQ-Säule appliziert. Der proteinhaltige Durchfluß wurde 1:4 mit NaCl-freiem PC-Puffer verdünnt, wodurch eine NaCl-Konzentration von 125 mM erreicht wurde. Daraufhin wurde das Proteingemisch einer PC-Behandlung unterzogen (siehe II.3.3.5). Die eluierten Proteine wurden nun in einem Verhältnis von 1:4 mit HEPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 μ M ZnCl₂, 10% Glycerol, 5 mM DTT) auf eine Endkonzentration von 200 mM NaCl verdünnt. Von den restlichen Verunreinigungen wurde das Protein mit Hilfe einer HE-Chromatographie gereinigt. Die sauberen NC-SP2 Fraktionen wurden zur Konzentrationssteigerung mit 80% Ammoniumsulfat gefällt, in Lagerpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 400 mM NaCl, 20 μ M ZnCl₂, 10% Glycerol, 5 mM DTT) gelöst und gegen den selben Puffer dialysiert.

Die Reinigung von CA146NC verlief sehr ähnlich, wies aber die folgenden Unterschiede auf: Der Lyse-Puffer enthielt 1 M NaCl und das Protein wurde bereits mit 25% Ammoniumsulfat gefällt. Des weiteren konnte auf die PC-Behandlung verzichtet werden. Daher wurde der HQ-Durchfluß mit HEPA-Puffer auf 125 mM NaCl verdünnt, sofort auf die HE-Säule appliziert und mit einem NaCl-Gradienten eluiert. Das gereinigte Protein wurde entweder mit 50% Ammoniumsulfat gefällt und in Lagerpuffer (25 mM MES, pH 6.5, 250 mM NaCl, 20 μ M ZnCl₂, 10% Glycerol, 5 mM DTT) gelöst, oder einer proteolytischen Spaltung unterzogen.

Hierzu wurde CA146NC gegen Verdau-Puffer (25 mM MES, pH 6.5, 250 mM NaCl, 50 μ M ZnCl₂, 10% Glycerol, 2 mM DTT) dialysiert und in einem molaren Verhältnis von 490:1 mit HIV-1 Protease (PR) versetzt (CA146NC:PR), welche in 20 mM MES, pH 6.0, 5% Glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM DTT vorlag. Das Reaktionsgemisch wurde

für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, 1:1 mit HEPA-Puffer (ohne NaCl) verdünnt und sofort auf die HE-Säule appliziert. Die NC-haltigen Fraktionen wurden in Biomax-Röhrchen konzentriert und gegen Lagerpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 μ M ZnCl₂, 10% Glycerol, 2 mM DTT) dialysiert.

II.3.3.9 Reinigung von humanem Cyclophilin A (CypA)

Das Reinigungsprotokoll für CypA basiert auf einer Vorschrift von (Liu *et al.*, 1990). CypA wurde, wie unter II.3.3.1 beschrieben, in *E.coli* exprimiert und diese (ca. 4 g) in 40 ml Lyse-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.8) aufgeschlossen. Der Zellschrott wurde bei 20000 rpm für 20 min (JA 25.50-Rotor) pelletiert. Ein Großteil der unerwünschten Proteine wurden durch die Zugabe von 35% Ammoniumsulfat gefällt und im Anschluß das Salz aus dem Überstand durch Dialyse (20 mM Tris-HCl, pH 7.8) entfernt. Nukleinsäuren wurden mit Hilfe einer HQ-Säule entfernt und der proteinhaltige Durchfluß erneut dialysiert (20 mM Tris-HCl, pH 7.8). Die bei pH 7.8 negativ geladenen Proteine wurden auf einer DEAE-Sepharose-Säule von dem Extrakt getrennt. Der nicht bindende Durchfluß wurde gesammelt und in einer Amicon Ultrafiltrationszelle mit Millipore YM3-Filtern eingeengt. Das Filtrat wurde gegen 30 mM MES, pH 6.0 und 1 mM EDTA dialysiert und CypA schließlich, durch die Applikation einer HS-Säule, von den restlichen Proteinen gereinigt. Die CypA enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration konzentriert und gegen 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 dialysiert.

II.3.4 *In vitro* Selbstassoziation von HIV Gag-abgeleiteten Proteinen

II.3.4.1 *In vitro* Selbstassoziation induziert durch Dialyse

II.3.4.1.1 Selbstassoziation von CA Proteinen

Protein Stammlösungen wurden, falls nicht gesondert vermerkt, auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml mit Lagerpuffer (30 mM MES, pH 6.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) verdünnt und gegen Assembly-Puffer (50 mM Tris, pH 8.0, 1 M NaCl, 1 mM DTT, oder bis zu 50 mM DTT im Fall von CA(G89C)) bei 4°C für mindestens 2 h dialysiert.

Um den Einfluß von Cyclophilin A (CypA) auf die *in vitro* Assemblierung zu testen, wurde CA, vor der Dialyse gegen Assembly-Puffer, mit gereinigtem CypA in molaren Verhältnissen zwischen 1:10 und 3:1 (CypA/CA) gemischt. Alternativ wurden bereits gebildete CA-Assoziate in einem molaren Verhältnis von 3:1 mit CypA (CypA/CA) versetzt und bei 4°C inkubiert. Der zeitliche Verlauf der Reaktion wurde dokumentiert, indem zu verschiedenen Zeitpunkten nach CypA-Zugabe Proben zur elektronenmikroskopischen Analyse entnommen wurden.

II.3.4.1.2 Selbstassoziation von NC-haltigen Proteinen

Stammlösungen NC-haltiger Proteine wurden mit Lagerpuffer (30 mM MES, pH 6.0, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA und 2 mM bis 5 mM DTT) auf 2.0 bis 0.05 mg/ml verdünnt. In dem Reaktionsansatz wurden außerdem einzelsträngige, zum Teil an ihrem 5'-Ende mit Dansylchlorid markierte, DNA-Oligonukleotide mit Längen zwischen 6 und 73 Basen vorgelegt. Die Nukleinsäuremenge betrug jeweils 5% (w/w) bezogen auf die Masse an Protein. Anschließend wurde 2 h gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA und 2 mM DTT dialysiert. In der Regel hatten die Dialyseansätze ein Volumen von 20 µl.

Im Fall von Δ MA-CA-NC-SP2 wurden die *in vitro* gebildeten Produkte durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min gesammelt und in einem Viertel des Ausgangsvolumens resuspendiert.

II.3.4.2 *In vitro* Selbstassoziation induziert durch Verdünnung

Es wurden einzelsträngige, zum Teil an ihrem 5'-Ende mit Dansylchlorid markierte, DNA-Oligonukleotide mit Längen zwischen 6 und 73 Basen in Assembly-Puffer (50 mM MES, pH 6.0, 6.5, oder 50 mM HEPES, pH 7.0, 7.2, 7.4, 7.5, 7.6, oder 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, und je 100 bis 360 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT) bei 4, 10 oder 20°C vorgelegt. Stock-Lösungen von Δ MA-CA-NC-SP2 wurden in diesen Ansatz auf 2.0 bis 0.1 mg/ml verdünnt und für ca. 1½ h bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Die Nukleinsäuremenge betrug jeweils 5% (w/w) bezogen auf die Masse an Protein. Die *in vitro* gebildeten Produkte wurden zum Teil durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min gesammelt und in einem Viertel des Ausgangsvolumens resuspendiert.

II.4 Elektronenmikroskopische (EM) Methoden

II.4.1 Negativfärbung der *in vitro* assemblierten Partikel

Um *in vitro* gebildete Partikel elektronenmikroskopisch sichtbar machen zu können, ist deren Kontrastierung nötig. Eine Standardmethode hierfür ist die Negativfärbung mit Schwermetall-Salzen. Sie eignet sich optimal für Partikel mit einer Größe zwischen 10 und 200 nm. Die Metall-Salzlösung besetzt Hydratations -Regionen der molekularen Strukturen, wobei die Stärke der Kontrastierung von der Ladungsverteilung auf der Partikeloberfläche, sowie deren Grad an Hydrophilität abhängig ist.

Als Färbemittel wurde eine 2%ige Lösung des Schwermetall-Salzes Uranyl-Acetat (pH 4.2) verwendet, welches sich durch eine hohe Penetranz auszeichnet.

Es wurden Kohlenstoff beschichtete Kupfer-Träger (Formvar) mit 200 Maschen verwendet. Kohlenstoff verstärkt durch seine Hydrophobizität die Adsorption der Probe an der Trägoberfläche.

Zur Negativfärbung wurden 5 µl der dialysierten Proteinprobe auf einen Streifen Parafilm pipettiert und die EM-Trägernetze mit ihrer beschichteten Seite auf den Tropfen gelegt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde überschüssige Proteinlösung mit einem Filterpapier abgezogen und der Träger auf einen 5 µl-Tropfen Uranyl-Acetat-Lösung überführt. Nach weiteren 5 min wurde die überschüssige Färbelösung ebenfalls entfernt. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Die Träger wurden 5 min luftgetrocknet und anschließend mit Hilfe eines Philips CM120 Transmissionselektronenmikroskops bei 60 kV analysiert.

II.4.2 Ultradünnschnitt EM induzierter *E.coli*

Für die Darstellung von assemblierten Partikeln innerhalb von *E.coli* Zellen nach Induktion der entsprechenden rekombinanten Proteine wurde folgende Methode verwendet: 6 ml einer induzierten *E.coli* BL21 (DE3) Kultur wurden durch kurze Zentrifugation 14000 rpm für 20 s in einer Eppendorf Tischzentrifuge konzentriert. Das Zellpellet wurde in 500 µl einer 4% Paraformaldehyd-, 2% Glutaraldehyd-PBS Lösung aufgenommen, 5 min auf Eis inkubiert und mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Bakterien durch einen kurzen Zentrifugationsschritt geerntet und das feuchte Bakterienpellet in Zellulose-Kapillarröhrchen durch Kapillarkraft aufgesogen (Hohenberg *et al.*, 1994). Die Zellen wurden anschließend innerhalb der Kapillarröhrchen mit 1% OsO₄ in PBS für 30 min nachfixiert, mit Wasser gewaschen, mit einer 1%igen Uranyl-Acetat-Lösung für 30 min gefärbt und in einer steigenden Alkoholreihe dehydriert. Die Kapillarröhrchen wurden zum Schneiden in ERL Harz eingebettet und die Ultradünnschnitte mit 2% Uranyl-Acetat und Bleicitrat gegengefärbt. Die Schnitte wurden in einem Philips CM120 Transmissionselektronenmikroskop bei 80 kV analysiert.

II.4.3 Cryo-EM und Bildverarbeitung

Für die Analyse *in vitro* gebildeter Partikel mittels Cryo-Elektronenmikroskopie (Cryo-EM) (Dennis Thomas, EMBL-Heidelberg) wurden 4 µl der Proteinprobe auf spezielle Kupfer-Träger (Fukami & Adachi, 1965) bei Raumtemperatur appliziert. Um die Salzkonzentration der Probe zu erniedrigen, wurden die Trägernetze für ca. 20 s mit der Proteinseite nach oben auf einen Tropfen destilliertes Wasser gelegt. Überschüssiges Wasser wurde mit einem Filterpapier abgezogen und die Probe anschließend durch Eintauchen in flüssiges Ethan, welches mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, schockgefroren. Die Probe wurde in einen mit flüssigem Stickstoff

gekühlten Cryohalter (Gatan 656) überführt. Aufnahmen wurden mit einem Philips CM200 FEG bei 200 kV gemacht. Es wurden Bedingungen von niedriger Dosis ($5\text{--}10\text{ e}^-/\text{\AA}^2$) bei einer 38000fachen Vergrößerung und einem Defokus von ca. $-1.5\text{ }\mu\text{m}$ gewählt. Die Bilder wurden in einem Zeiss SCAI Scanner mit einer Auflösung von $3.62\text{ }\text{\AA}/\text{pixel}$ digitalisiert. Einzelne Zylinder wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms „SPIDER“ (Frank *et al.*, 1996) ausgewählt und ausgerichtet. Zur weiteren Bearbeitung der Bilder wurde das Programmpaket „Brandeis Helical“ (Owen *et al.*, 1996) verwendet. Die Primärbilder wurden Fourier-transformiert, wodurch die berechneten Streubilder entstanden. Die in den sogenannten „Layerlines“ beinhalteten Daten wurden ohne zu mitteln verwendet, um gefilterte, dreidimensionale Abbildungen zu erstellen.

II.5 Spektroskopische Methoden

Für spektroskopische Messungen wurden Proben zur Entfernung von Aggregaten zentrifugiert und Puffer filtriert.

II.5.1 UV-Absorptionsspektroskopie

Die UV-Absorptionsspektroskopie wurde zur Konzentrationsbestimmung von Protein oder Nukleinsäure enthaltenden Lösungen eingesetzt. Sie wurden an einem DU Serie 640-Einstrahlphotometer (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) mit Puffer als Referenz durchgeführt. Diesen Messungen liegt das Lambert-Beer'sche Gesetz zugrunde:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. I.1})$$

Dabei entspricht ϵ dem molaren Extinktionskoeffizienten in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, c der Konzentration in M und d der Schichtdicke der Küvette in cm.

II.5.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden über Messungen der Absorption bei 280 nm berechnet. Der molare Extinktionskoeffizient (ϵ) kann aus der Aminosäurezusammensetzung in Kombination mit spektroskopisch gesammelten Daten nach Gill und von Hippel ermittelt werden (Gill & von Hippel, 1989). In Proteinen tragen die aromatischen Seitenketten Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, aber auch Disulfidbrücken, in unterschiedlichem Maß zur Absorption bei. Daher kann aufgrund der Anzahl dieser Gruppen im jeweiligen Protein dessen ϵ , zunächst ohne Berücksichtigung der Proteinfaltung (denaturierter Zustand), wie folgt berechnet werden:

$$\epsilon_{M, GdmCl} = a \cdot \epsilon_{M, Trp} + b \cdot \epsilon_{M, Tyr} + c \cdot \epsilon_{M, Cys} \quad (\text{Gl. I.2})$$

wobei $\varepsilon_{M,Trp}$, $\varepsilon_{M,Tyr}$, $\varepsilon_{M,Cys}$, den molaren Extinktionskoeffizienten von Tryptophan ($5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Tyrosin ($1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und Cystin ($125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a , b und c der Anzahl des jeweiligen Aminosäurerestes pro Proteinmolekül entsprechen. Der auf diese Weise erhaltene Wert wird nun noch für das native Protein korrigiert:

$$e_{M,nat} = (A_{nat}) \cdot (e_{M,GdmCl}) / (A_{GdmCl}) \quad (\text{Gl. I.3})$$

Dabei entsprechen A_{nat} und A_{GdmCl} den Absorptionswerten des nativen, beziehungsweise denaturierten Proteins. Den spezifischen Extinktionskoeffizienten erhält man nun, indem man den molaren Extinktionskoeffizienten durch das Molekulargewicht des jeweiligen Proteins dividiert. Es wurden die folgenden spezifischen Extinktionskoeffizienten (bei 280 nm) für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine ermittelt (Tab. II.1):

Protein	$\varepsilon_{\text{spez.}} (A_{280nm}^{1\%,1cm}) [l(g^{-1})(cm^{-1})]$
HIV-1 CA(WT)	1.33
HIV-2 CA(WT)	1.44
HIV-1 CA(G89L)	1.33
HIV-1 CA(G89F)	1.33
HIV-1 CA(G89C)	1.33
HIV-1 CA(G89W)	1.51
HIV-1 CA-NC	1.19
HIV-2 CA-NC	1.46
HIV-1 Δ MA-CA-NC-SP2	1.21
HIV-1 Δ MA-CA	1.14
HIV-1 CA146NC	0.83
HIV-1 NC	0.91
HIV-1 NC-SP2	1.54
hCypA	0.48

Tab. II.1: Spezifische Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine.

UV-Absorptionsspektren zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden von 220 bis 350 nm in 1 cm Quarzküvetten aufgenommen und, wenn nötig, um Streuanteile korrigiert.

Zum Teil wurde der Proteingehalt einer Lösung auch nach (Bradford, 1976) bestimmt. Dieses Prinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G250 von 465 nm nach 595 nm, die nach Bindung an Proteine eintritt. Es wurde das Bradford-Reagens der Firma BioRad (München) nach Angaben des Herstellers verwendet. Eichkurven wurden mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard hergestellt.

II.5.1.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, für das in erster Linie die Basen als absorbierende Chromophore verantwortlich sind, liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml hat doppelsträngige DNA eine OD₂₆₀ von 1.0. Damit läßt sich die DNA-Konzentration berechnen. Da Proteine eine maximale Extinktion bei 280 nm aufweisen, ist der Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ ein Maß für den Reinheitsgrad der gelösten DNA. Bei einer sauberen DNA Präparation sollte der Quotient einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben.

Eine genauere Angabe erlaubt die Berechnung des Extinktionskoeffizienten anhand der Basenzusammensetzung. Es wurde die mit dem Spektrophotometer (DU Serie 640, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) mitgelieferte Software verwendet, um die Konzentration kurzer Oligonukleotide nach diesen Gesichtspunkten zu bestimmen.

Analog läßt sich der RNA-Gehalt von Lösungen berechnen. Sie hat bei einer Konzentration von 40 µg/ml eine OD₂₆₀ von 1.0.

II.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz wird beobachtet, wenn Elektronen von einem angeregten Zustand in den Grundzustand zurückkehren. Das emittierte Licht ist aufgrund gleichzeitig ablaufender, strahlungsloser Prozesse (Wärmeabgabe und Vibration) energieärmer, und daher im Vergleich zum absorbierten Licht zu längeren Wellenlängen verschoben. Die Intensität der Fluoreszenzemission von Proteinen ist durch die Aminosäuren Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Phe) im Verhältnis 1100:200:8 bestimmt (Schmid, 1989). Praktisch bedeutet dies, daß die Proteinfluoreszenz hauptsächlich von den Trp-Resten dominiert wird. Die Fluoreszenzintensität und, im Fall von Trp, die Lage des Emissionsmaximums, sind durch die direkte Umgebung (polar, unpolar) stark beeinflusst, so daß Messungen der Fluoreszenz Aufschluß über die Änderung der Tertiärstruktur oder die Bindung des Proteins an einen Liganden geben können.

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Aminco Bowman *Series 2* Fluorimeter (SLM, Urbana, IL, USA) vorgenommen. Die Photomultiplier-Spannung lag zwischen 500 und 950 V.

II.5.2.1 Messung von Proteinspektren

Emissionsspektren wurden nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 2 nm), mit 1 nm/s, einer Bandbreite von 4 nm in der Emission und einer Integrationszeit von 1 s in einem Bereich von 300 bis 440 nm aufgenommen. Zur Aufnahme von Anregungsspektren wurde die Anregungswellenlänge mit 2 nm Bandbreite von 200

bis 300 nm variiert und die Fluoreszenzemission im Emissionsmaximum (333 nm) (Bandbreite 4 nm, 1 nm/s, Integrationszeit 1 s) gemessen. Die Spektren wurden um den Beitrag des Puffers korrigiert und bei Temperaturen von 15 oder 20°C aufgenommen.

Zum Teil wurde die wiederholte Aufnahme von Spektren derselben Probe dazu verwendet, um den zeitlichen Verlauf einer Reaktion zu verfolgen. Die Veränderung der Emissionsmaxima wurde daraufhin gegen die Zeit aufgetragen und die daraus entstandene Kinetik unter Zuhilfenahme einer einfachen Exponentialfunktion wie folgt ausgewertet:

$$y = A_0 \cdot \exp(-kt) + V \quad (\text{Gl. I.4})$$

wobei die Gleichung eine exponentielle Abnahme mit der Rate k über die Zeit t beschreibt. Die Parameter V und A_0 dienen zur Anpassung des Untergrunds, beziehungsweise der Amplitude der Reaktion. Aus der Reaktionsrate lässt sich die Zeitkonstante τ berechnen:

$$\tau = 1/k \quad (\text{Gl. I.5})$$

die sich wiederum als Halbwertszeit $t_{1/2}$ ausdrücken lässt:

$$t_{1/2} = \tau \cdot \ln 2 \quad (\text{Gl. I.6})$$

II.5.2.2 Messung pH-induzierter Faltungsübergänge

Die pH-Stabilität von Δ MA-CA-NC-SP2 wurde durch gemittelte, zeitabhängige Emissionsmessungen (333 nm) von 1 min bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und Bandbreiten von 2 nm bestimmt. Dazu wurden 0.1 mg/ml Δ MA-CA-NC-SP2 bei 21°C für 24 h in den folgenden Puffern (je 50 mM Puffersubstanz, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT) inkubiert:

2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 5.8 6.0 6.2 6.5 6.8 7.0 7.2 7.4 7.5 7.6 7.8 8.0 8.2 8.5 9.0 9.5
 Glycin/HCl Na/Ac MES Tris-HCl

Alle Messungen wurden um den Beitrag der entsprechenden Puffer korrigiert.

II.5.2.3 Tryptophanfluoreszenz Messungen

(Bisswanger, 1979)

Die Messung der Tryptophanfluoreszenz ist eine für die Untersuchung von Protein/Ligand-Wechselwirkungen bewährte Methode (Eftink, 1997). Dabei dienen die Trp-Reste als intrinsische Proben für Ligandeninteraktion, da ihre Fluoreszenzeigenschaften empfindlich von ihrer direkten Umgebung abhängen. So kann z.B. die Quantenausbeute eines vollständig zwischen Nukleinsäurebasen interkalierten Trp auf nahezu Null absinken (Brun *et al.*, 1975; Maurizot *et al.*, 1978; Rajeswari *et al.*, 1987). Die Abnahme der Tryptophanfluoreszenzintensität eines

Proteins dient daher als Maß für die Komplexbildung des Proteins mit Nukleinsäuren. Fluoreszenztitrationsen wurden in einem Volumen von 700 µl bei 20°C durchgeführt. Zu 200, 400, 500 oder 1000 nM vorgelegtem Protein (angeregt bei 295 nm; 2 nm Bandbreite) wurden 0.5, 1, 2, 4 und 8 µl einer 100 µM Oligostammlösung titriert und manuell gemischt. Die Messungen wurden in Gegenwart von 100 oder 180 mM NaCl in 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.04% PEG 20000, 2 mM DTT erstellt. Die Nukleinsäurekonzentration wurde schrittweise erhöht und die Abnahme der Protein-Tryptophanfluoreszenz nach Gleichgewichtseinstellung, bei 334 nm und einer Bandbreite von 4 nm verfolgt. Zum Teil wurden Messungen vor Titrationsbeginn oder nach abgeschlossener Titration mit 2 µl (2 mg/ml und 3 U/ml bei 25°C) Phosphodiesterase (PDE) versetzt. Titrationskurven erhält man, indem der Mittelwert der Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Titrationsstufe gegen die Konzentration des Titranten aufgetragen wird. Extrapoliert man die linearen Anfangs- und Endbereiche dieser hyperbolen Kurve, läßt sich der Sättigungspunkt ermitteln. Der Schnittpunkt der beiden Geraden entspricht der molaren Menge an Liganden (Oligo), die nötig ist, um die vorgegebene Proteinmenge zu sättigen, d.h. das Lot auf die Abszisse ergibt $n[O]_0$ und damit die Stöchiometrie der Reaktion. Akkurate Messungen der Stöchiometrie sind nur bei hohen Konzentrationen (weit über dem K_d) möglich, da dann die linearen Bereiche besonders gut ausgeprägt sind. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) wurden Titrationskurven mit dem Programm GraFit Version 4.0 (Erithacus Software, Staines, UK) ausgewertet. Dabei wurden die Daten an eine quadratische Gleichung angepaßt, welche die Komplexkonzentration in einem bimolekularen Gleichgewicht unter der Annahme einer 1:1-Stöchiometrie beschreibt:



wobei nach dem Massenwirkungsgesetz

$$[P]_0 = [P] + [PO] \text{ und } [O]_0 = [O] + [PO] \quad (\text{Gl. I.8 und Gl. I.9})$$

gilt und sich damit K_d wie folgt ergibt:

$$K_d = \frac{([P]_0 - [PO]) \cdot ([O]_0 - [PO])}{[PO]} \quad (\text{Gl. I.10})$$

$[P]$ und $[O]$ sind die Konzentrationen an freiem Protein, bzw. Ligand (Oligo), $[P]_0$ und $[O]_0$ die Gesamtkonzentrationen an Protein und Ligand, $[PO]$ die Konzentration des Protein-Oligo-Komplexes und K_d die Dissoziationskonstante. Auflösen von Gl. I.10 nach $[PO]$ liefert:

$$[PO] = \frac{[P]_0 + [O]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [O]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [P]_0 \cdot [O]_0} \quad (\text{Gl. I.11})$$

Vorausgesetzt wird, daß das Meßsignal direkt proportional zur Konzentration des Protein-Oligo-Komplexes ist. So ist die partielle Abnahme der Fluoreszenzemission ΔF pro Titrationsschritt gleich dem Bindungsgrad $[PO]/[P]_0$, multipliziert mit der maximalen Fluoreszenzabnahme ΔF_{\max} (Amplitude), die man bei Sättigung erhält. Damit ergibt sich die Gesamtfluoreszenz F aus der Summe der Grundfluoreszenz F_0 und der Fluoreszenzänderung des jeweiligen Titrationsschritts:

$$F = F_0 + \Delta F_{\max} \cdot \frac{[PO]}{[P]_0} \quad (\text{Gl. I.12})$$

Zusammen mit Gl. I.11 ergibt sich:

$$F = F_0 + \Delta F_{\max} \cdot \frac{\frac{[P]_0 + [O]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [O]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [P]_0 \cdot [O]_0}}{[P]_0} \quad (\text{Gl. I.13})$$

Bei der Anpassung der experimentellen Daten (F gegen $[O]_0$) unter Verwendung von Gl. I.13 wurde $[P]_0$ konstant gehalten und die Parameter F_0 , ΔF_{\max} und K_d nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate aufgelöst.

Wenn nötig wurden Titrationskurven um Konzentrationslöschung („inner filter effect“) korrigiert werden (Birdsall *et al.*, 1983).

II.5.2.4 Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) Messungen

(Bisswanger, 1979)

Überlagert sich das Emissionsspektrum eines Chromophors (Donor) mit dem Absorptionsspektrum eines zweiten Chromophors (Akzeptor), kann man bei Anregung des ersten eine Fluoreszenzemission des zweiten beobachten, vorausgesetzt, die beiden optisch aktiven Gruppen sind weniger als 6 nm voneinander entfernt. Diese Art der strahlungslosen Energieübertragung nennt man Fluoreszenzresonanzenergietransfer.

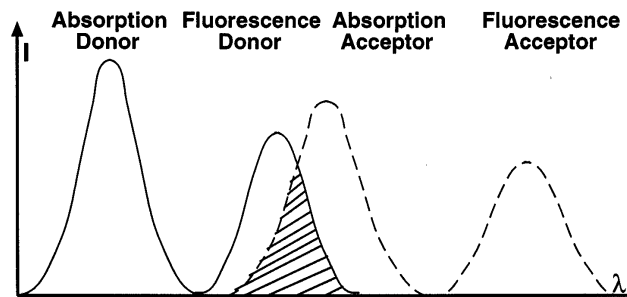


Abb. II.1: Anordnungsschema der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima von Donor zu Akzeptor beim Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET).

Dabei ist die Effizienz der Energieübertragung umgekehrt proportional der sechsten Potenz des Abstandes r der beiden Chromophore voneinander. Für eine optimale Resonanz müßten ferner ihre beiden Dipole parallel zueinander orientiert sein.

Das Phänomen des FRET wurde für Gleichgewichtstitrationen von Dansyl-markierten Oligonukleotiden (16mer) mit Protein ausgenutzt (Latt *et al.*, 1970). Bei den Titrations wurde die Fluoreszenzzunahme der Dansylgruppe (Akzeptor) bei 530 nm verfolgt, nachdem die Tryptophanreste (Donor) der Proteine bei 280 nm angeregt worden waren. Die Temperatur betrug 20°C, die Bandbreiten je 4 nm. Die Oligonukleotide wurden in 50 mM HEPES, pH 7.5, 100 oder 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT zu Konzentrationen von 25, 50, 100, 200, 400 und 500 nM vorgelegt und Proteinstocklösungen in 1 bis 4 µl Schritten hinzu pipettiert und manuell gemischt. Zum Teil wurden Messungen vor Titrationsbeginn oder nach abgeschlossener Titration mit 2 µl (2 mg/ml und 3 U/ml bei 25°C) Phosphodiesterase (PDE) versetzt. Titrationskurven wurde wie unter II.5.2.3 beschrieben erstellt und diese mit Hilfe des Programms Scientist *Version* 2.0 (Micomath Software, Salt Lake City, USA) in einer globalen Fit Prozedur analysiert. In einem globalen Fit werden mehrere Bindungskurven, die bei unterschiedlichen Konzentrationen an vorgelegten dansylierten Oligonukleotiden unter Beibehaltung der Photomultiplier-Spannung aufgenommen wurden, simultan angepaßt. Dem Fitprotokoll lag ein Bindungsmodell mit 2:1 Stöchiometrie (Protein: Oligo) zugrunde (Thomä N. persönliche Mitteilung) Daher wurden die unter II.5.2.3 beschriebenen Gleichungen um ein zweites Bindungsgleichgewicht erweitert:



II.5.3 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

CD-Spektren wurden an einem AVIV 62 DS Spektropolarimeter im Fern-UV Bereich (190-250 nm) aufgenommen. In diesem Wellenlängenbereich (Amid-Region) dominieren die Signale der Peptidbindungen und damit sind Aussagen über den Gehalt eines Proteins an Sekundärstrukturelementen möglich. Es wurden Proteinkonzentrationen von 1 mg/ml, 0.1 mm Quarzküvetten und 21°C gewählt. Die Bandbreite betrug 1 nm und die Signale wurden über 30 s pro nm gemittelt. Die molare Restelliptizität ($[\Theta]_{MRW}$) (molare Elliptizität bezogen auf die mittlere Masse der Aminosäurereste) wurde nach folgender Formel berechnet (Schmid, 1989):

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot M_R \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{As}} \quad (\text{Gl. I.15})$$

wobei $[\Theta]_{MRW}$ die molare Restelliptizität ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$), $[\Theta]$ die gemessene Elliptizität (deg), M_R das Molekulargewicht des Proteins (g/mol), c die Proteinkonzentration (mg/ml), d die Schichtdicke der Küvette (cm) und N_{As} die Anzahl der Aminosäuren im Protein darstellt.

Die Messungen wurden bei pH 6 (30 mM MES; pH 6; 0.5 M NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM DTT), pH 8 (50 mM Tris; pH 8; 0.5 M NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM DTT) und pH 6 in Anwesenheit von 4.3 M des Denaturierungsmittels GdmCl durchgeführt und jeweils um den Beitrag des Puffers korrigiert. Vor der spektralen Analyse wurden die Proben, in den entsprechenden Puffern, für 2 h bei 4°C inkubiert.

II.5.4 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) Spektroskopie

Bindungsexperimente von CypA an CA-Proteine wurden mit Hilfe eines BIACORE 2000 Geräts durchgeführt. Hierzu wurden die verschiedenen GST-CA-Fusionsproteine direkt aus *E.coli* Lysaten an der anti-GST-Sensoroberfläche immobilisiert. Ihre Interaktion mit in Lösung befindlichem, gereinigtem CypA wurde, wie bereits beschrieben (Yoo *et al.*, 1997) verfolgt. Die Bindungs- und Dissoziationskinetiken wurden durch nicht lineare Anpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate einem einfachen Bindungsmodell (1:1 Stöchiometrie) zufolge angepaßt, und somit die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_d) der einzelnen Interaktionen bestimmt. Die Auswertung geschah entsprechend der Richtlinien des BIACORE-Handbuchs.

II.5.5 Dynamische Lichtstreuung

(ProteinSolutions, 1998)

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung kann die Größe von in Lösung befindlichen Molekülen bestimmt werden. Dabei wurde das Licht eines Lasers mit einer Wellenlänge von 780-830 nm auf eine Probe eingestrahlt und die Intensität des durch die Moleküle gestreuten Lichts im rechten Winkel zur Lichtquelle, mit einem DynaPro MSTC (Protein Solutions Inc., Charlottesville, VA, USA), in einer 45 µl-Küvette gemessen. Durch die Anwendung einer zeitlichen Autokorrelationsfunktion ($AKF(t)$) kann dann die Fluktuationsstärke des Streulichts analysiert werden. Grundsätzlich läßt sich sagen, daß sich kleine Moleküle in Lösungen mit höherer Geschwindigkeit bewegen als große (Brown'sche Molekularbewegung) und damit deren Streulichtintensität schneller schwankt. Im Falle eines Einkomponentensystems (monomodale Verteilung) ergibt sich die AKF nach folgender Gleichung (q ist der Wellenvektor des gestreuten Lichts):

$$AKF(t) = 1 + \exp(-2D_T q^2 t) \quad (\text{Gl. I.16})$$

Daraus ergibt sich der translationale Diffusionskoeffizient D_T der Moleküle. Dieser kann mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung in den hydrodynamischen Radius R_H umgerechnet werden:

$$D_T = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \eta \cdot R_H} \quad (\text{Gl. I.17})$$

wobei k_B die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur (K) und η die Viskosität der Lösung darstellen. Ausgehend von einer Standardkurve für globuläre Proteine kann man aus dem hydrodynamischen Radius das Molekulargewicht der gelösten Proteine ableiten.

Für Mehrkomponentensysteme setzt sich die AKF aus verschiedenen Beiträgen zusammen. Werden wenige diskrete Größen angenommen, so ergibt sich:

$$AKF(t) = b + \sum_{j=1}^k c_j \cdot \exp(-t/\tau_j) \quad (\text{Gl. I.18})$$

wobei k gleich 1 ist im Falle einer monomodalen, gleich 2 bei einer bimodalen Verteilung und die Parameter b , c_j und die Zerfallszeitkonstanten τ_j angepaßt werden. Die Amplituden c_j entsprechen den Intensitäten des von den verschiedenen Partikeln gestreuten Lichts. Der Grundlinienparameter b sollte idealerweise gleich 1.0 sein.

Diese Funktion wurde für die Anpassung der Meßdaten nach der Methode der Kumulanten Analyse verwendet. Liegt in einem System eine Größenverteilung vor, so kann die AKF mit Hilfe der Gleichung

$$AKF(t) = 1 + \int P(\Gamma) \cdot \exp(-2\Gamma t) \cdot d\Gamma \quad (\text{Gl. I.19})$$

wobei $P(\Gamma)$ die Verteilungsfunktion der Zerfallsrate ist und $\exp(-2\Gamma t)$ den Zerfall jeder einzelnen Partikelgröße beschreibt, ausgedrückt werden. Diese Gleichung wird durch Regularisierungsverfahren an die gemessene AKF angepaßt und man erhält daraus eine Größenverteilungsfunktion.

Unterschiedliche Mengen an Δ MA-CA-NC-SP2 (0.3 bis 1.5 mg/ml) wurden in An- oder Abwesenheit von 5% Acetonitril in 30 mM MES, pH 6.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA und 2 mM DTT bei 6°C analysiert. Bei Messungen in Gegenwart von Acetonitril wurden die Proben zuvor für 2 h bei 4°C inkubiert. Alle Proben wurden vor Beginn der Messung durch Filter mit einer Porengröße von 0.1 µm filtriert. Die Sensitivität der Photodiode (avalanche photo diode, APD) war auf 100% festgesetzt, der Quotient aus Signal zu Rauschen betrug $S/N = 2$ und die maximale Dauer der Datenerhebung pro Meßpunkt 20 s, wobei jede Messung aus mindestens 20 Datenpunkten bestand. Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des mitgelieferten Programms DYNAMICS Version 4.0 (Protein Solutions Inc., Charlottesville, VA, USA) mit 2 verschiedenen Algorithmen (Kumulanten, Regularisierung) ausgewertet.

II.5.6 Isothermale titrationskalorimetrische (ITC) Messungen

Kalorimetrische Messungen wurden an einem Microcal MCS Titrationskalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) durchgeführt. In der Zelle ($V_0 = 1.3656$ ml)

wurden 10 bis 50 μM Protein in 50 mM HEPES, pH 7.5, 180 mM NaCl und 2 mM DTT vorgelegt und mit Oligostocklösung (200 bis 500 μM in identischem Puffer) in der Titrationsspritze in 2-8 μl -Schritten bis zur Sättigung titriert. Die Temperatur betrug 20°C, die Injektionsgeschwindigkeit 1 $\mu\text{l/s}$, die Integrationszeit 2 s. Integration der eingebrachten Wärmeleistung ($\mu\text{cal/s}$), die benötigt wird um eine Referenzzelle und eine Probenzelle bei jedem Titrationsschritt auf konstanter Temperatur zu halten, liefert die Wärmemenge der einzelnen Titrationsschritte. Diese Umwandlung in Wärmemengen und Kurvenangleich erfolgte unter Verwendung des Programms Origin für ITC Version 2.9 (MicroCal Software Incorporation, Northampton, MA, USA). Dabei wurde die, wie folgt, hergeleitete Gleichung zu Hilfe genommen: Die Assoziationsgleichgewichtskonstante K (M^{-1}) für die Bindung des Oligonukleotids O an ein Protein P wird als Funktion des Bindungsgrades v ausgedrückt:

$$K = \frac{n}{(1-n) \cdot O} \quad (\text{Gl. I.20})$$

Dabei ist $[O]$ die Konzentration an freiem Oligonukleotid und v der Anteil der mit Oligonukleotid besetzten Bindungsstellen $[PO]/[P]_0$. Die Massenbilanz für das Oligonukleotid lautet:

$$[O]_0 = [O] + n \cdot v \cdot [P]_0 \quad (\text{Gl. I.21})$$

wobei $[O]_0$ und $[P]_0$ die Gesamtkonzentrationen des Oligonukleotids bzw. Proteins und n die Anzahl aktiver Bindungsstellen darstellen. Kombination von Gl. I.20 und Gl. I.21 führt zu:

$$n^2 - n \cdot \left(1 + \frac{[O]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot K \cdot [P]_0} \right) + \frac{[O]_0}{n \cdot [P]_0} = 0 \quad (\text{Gl. I.22})$$

Die Wärmemenge Q (J) der Lösung bei einem Bindungsgrad v , relativ zu $v = 0$, ist:

$$Q = n \cdot v \cdot [P]_0 \cdot \Delta H \cdot V_0 \quad (\text{Gl. I.23})$$

ΔH ist die molare Reaktionsenthalpie der Ligandenbindung (J/mol), V_0 das Meßvolumen der Zelle. Lösen von (Gl. I.22) nach v und Einsetzen in (Gl. I.23) liefert Gl. I.24:

$$Q = \frac{n \cdot [P]_0 \cdot \Delta H \cdot V_0}{2} \cdot \left(1 + \frac{[O]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot K \cdot [P]_0} - \sqrt{\left(1 + \frac{[O]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot K \cdot [P]_0} \right)^2 - \frac{4 \cdot [O]_0}{n \cdot [P]_0}} \right) \quad (\text{Gl. I.24})$$

Das Anpassen einer Kurve nach (Gl. I.24) an die gemessene Wärmemenge, liefert die Gleichgewichtskonstante K , die molare Bindungswärme ΔH , die Anzahl aktiver Bindungsstellen n und damit die Stöchiometrie der Reaktion.

III Ergebnisse

III.1 *In vitro* Assembly Eigenschaften von HIV wildtyp (WT)-CA und CA-Varianten mit reduzierter Affinität gegenüber CypA

Neben ihrer strukturbildenden Funktion sind die HIV Gag-Polyproteine auch für die Verpackung essentieller Faktoren zellulären Ursprungs verantwortlich. So inkorporiert HIV-1 die zytoplasmatische Peptidyl Cis-Trans Isomerase (PPIase) Cyclophilin A (CypA) über eine direkte Wechselwirkung mit der CA-Domäne in das Virion (Luban *et al.*, 1993). Die Proteine liegen in einem molaren Verhältnis von 1:10 von CypA zu CA im Viruspartikel vor. Der Einbau von CypA kann jedoch durch Zugabe der immunsuppressiven Substanz Cyclosporin A blockiert werden, was wiederum in einer Verringerung der Infektiosität resultiert (Braaten *et al.*, 1996; Bukovsky *et al.*, 1997; Franke *et al.*, 1994; Thali *et al.*, 1994). Im Fall von HIV-1 wird CypA eine Funktion in der frühen Phase des viralen Replikationszyklus, also während des Eintritts in die Zielzelle, zugesprochen (Braaten *et al.*, 1996). Für HIV-2 hingegen wurde weder der Einbau von CypA, noch eine Sensitivität der Viren gegenüber Cyclosporin A festgestellt.

In unserem Labor wurde ein *in vitro* System zur Multimerisierung von CA-Proteinen etabliert (Gross *et al.*, 1997). Gereinigtes HIV-1 CA lagert sich bei hohen Proteinkonzentrationen und hoher Ionenstärke zu helikal organisierten, tubulären Partikeln zusammen (siehe I.2.1). Es wird vermutet, daß sich die Anordnung von CA in den Zylindern und in den konischen Kapsiden reifer HIV-1 Partikel entspricht. Ingolf Gross konnte in ersten Versuchen zeigen, daß CypA auch in diesem *in vitro* System einen Einfluß ausübt (Gross *et al.*, 1998). So schien die Anwesenheit großer Mengen CypA während der Multimerisierungsreaktion die Bildung von CA-Zylindern zu unterdrücken. Dieser Effekt konnte jedoch durch die Zugabe von Cyclosporin A wieder aufgehoben werden.

Um den von CypA induzierten molekularen Mechanismus genauer zu definieren, sollten CA-Varianten mit reduzierter Affinität gegenüber CypA hergestellt werden. Ihr Verhalten während der *in vitro* Multimerisierung sollte mit dem der wildtyp Proteine aus HIV-1 und HIV-2 verglichen werden.

III.1.1 Herstellung und Analyse von CA Varianten mit reduzierter Affinität gegenüber CypA

Der Einfluß von CypA auf das Assemblierungsverhalten von CA sollte mit Hilfe des *in vitro* Systems untersucht werden. Hierzu wurde eine Reihe von Varianten des

Proteins HIV-1 CA mit Substitutionen an Position 89 sowie CA aus HIV-2 hergestellt. Glycin89 (G89) befindet sich innerhalb der CypA-Bindeschleife und spielt vermutlich eine wichtige Rolle für die spezifische Interaktion von CA mit CypA (siehe I.3.2). Die Analyse der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von CA komplexiert mit CypA ergab, daß die CypA-Schleife exakt in die Bindetasche von CypA paßt (Gamble *et al.*, 1996). Die dafür nötige Konformation kann von der CypA-Schleife nur angenommen werden, weil sich in Position 89 ein Glycin, also eine Aminosäure ohne störende Seitenkette befindet. Um einen meßbaren Effekt auf die Affinität von CA zu CypA zu erzielen, wurde G89 durch die großen und hydrophoben Aminosäuren Leucin (L), Phenylalanin (F), Cystein (C) und Tryptophan (W) ersetzt (Abb. III.1).

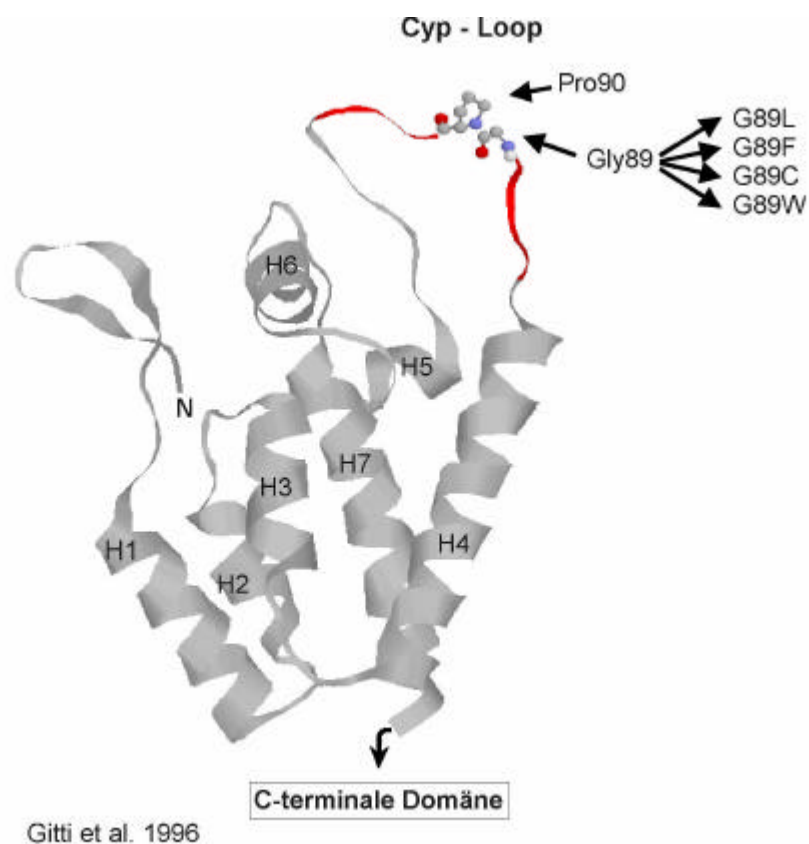


Abb. III.1: Dreidimensionale Struktur der N-terminalen Domäne (Aminosäuren 1-151 mit den α -helikalen Bereichen H1-H7) des CA Proteins von HIV-1 (Gitti *et al.*, 1996). Die CypA-Bindeschleife (Cyp-Loop) mit den für die Erkennung wichtigen Resten (Pro90 und Gly89) sind hervorgehoben. Die an Position Gly89 eingeführten Aminosäureaustausche sind gezeigt.

Die Aminosäureaustausche in Position 89 wurden durch eine einzige PCR-Reaktion mit einem in dem entsprechenden kodierenden Triplett degenerierten Startermolekül der Sequenz TT/G G/C eingeführt (siehe VII.1). Daher entstanden die vier Kodons TTG (Leu), TTC (Phe), TGG (Trp) und TGC (Cys) in statistischen Mengen. Als Matrize diente eine modifizierte Version des Vektors pET-1CA-WT (Gross *et al.*, 1997). Durch einen Partialverdau mit *SphI* und anschließendem Entfernen der

3'überhängenden Enden mit Hilfe der T4-Polymerase, wurde die *SphI*-Schnittstelle im Vektor eliminiert. Es entstand das Plasmid pET-1CA-WT *SphI*⁻. Das Gemisch aus PCR-Produkten wurde mit den Restriktionsenzymen *SphI* und *SpeI* geschnitten und das daraus resultierende 60 bp Fragment in den pET-1CA-WT *SphI*⁻ Vektor ligiert, welcher zuvor mit denselben Enzymen verdaut worden war. Nach Transformation des Vektorgemisches wurde die Plasmid-DNA von Einzelkolonien sequenziert und dadurch die einzelnen Punktmutationen identifiziert.

Die CA-kodierende Sequenz von HIV-2 wurde ausgehend von dem HIV-2 Klon ROD (Guyader *et al.*, 1987) mittels PCR amplifiziert. Die Startermoleküle wurden so gewählt, daß die am 5'Ende eingeführte *NdeI*-Schnittstelle mit dem Kodon des Translationsstarts überlappte und am 3'Ende zwei Stop-Kodons gefolgt von einer *BglII*-Schnittstelle entstanden. Das PCR-Fragment wurde mit *NdeI* und *BglII* geschnitten und in die *NdeI*-*BamHI* Schnittstellen des pET 11c Vektors subkloniert. Es entstand das Plasmid pET-2CA-WT. Die entsprechenden auf pET11c basierenden CA-Expressionsplasmide (siehe II.2.1.3) wurden in *E.coli* BL21(DE3) Zellen exprimiert und die gebildeten CA Proteine durch eine Abfolge aus Zentrifugationsschritten, einer Ammoniumsulfatpräzipitation (30%), sowie Anionen- und Kationenaustausch Chromatographien gereinigt (siehe II.3.3.5).

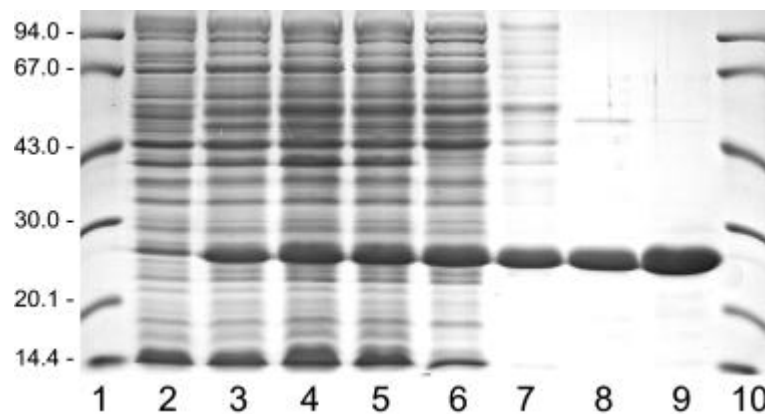


Abb. III.2: Reinigung von wildtyp HIV-1 CA. Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (17.5%; 200:1) eines Reinigungsverlaufs. Spuren: 2 und 3, Zellysate uninduzierter und induzierter Bakterien; 4, 5 und 6, lösliche Überstände der differentiellen Zentrifugationsschritte bei 5000 rpm, 15000 rpm bzw. 38000 rpm; 7, gelöstes Pellet der 30% Ammoniumsulfatfällung; 8, ungebundenes Material der Anionenaustauschbehandlung; 9, gelöstes Pellet der, einer kationenaustauscher Chromatographie nachfolgenden 50% Ammoniumsulfatfällung. Molekulargewichtsmarker sind in Spuren 1 und 10 aufgetragen und auf der linken Seite gekennzeichnet (in kD).

Ein typischer Reinigungsverlauf ist exemplarisch für das wildtyp CA Protein aus HIV-1 in Abb. III.2 dargestellt.

Die übrigen CA-Proteine wurden auf analoge Weise aus dem Gemisch mit *E.coli* Proteinen isoliert, wodurch die in Abb. III.3 gezeigten, gereinigten CA-Proteine erzeugt wurden. Die densitometrische Analyse (siehe II.3.2.2) ergab für alle Proteine Reinheitsgrade von >98% (Abb. III.3, Spuren 2-5). Für die Proteine CA(G89W) und

HIV-2 CA konnten aufgrund ihrer geringeren Löslichkeit und höheren Verlusten an den Chromatographiematerialien nur Reinheitsgrade von 86%, beziehungsweise 95% erzielt werden (Abb. III.3, Spuren 6 und 7). Da der N-Terminus von CA wichtig für die Bildung tubulärer Strukturen *in vitro* zu sein scheint (Gross *et al.*, 1997), wurde die N-terminale Sequenz von gereinigtem HIV-2 CA bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß das Initiator-Methionin quantitativ abgespalten wird (J. Konvalinka, persönliche Mitteilung). Dies wurde bereits für HIV-1 CA beobachtet (Gross *et al.*, 1997) und wird daher auch für die G89 Varianten des HIV-1 CA Proteins angenommen.

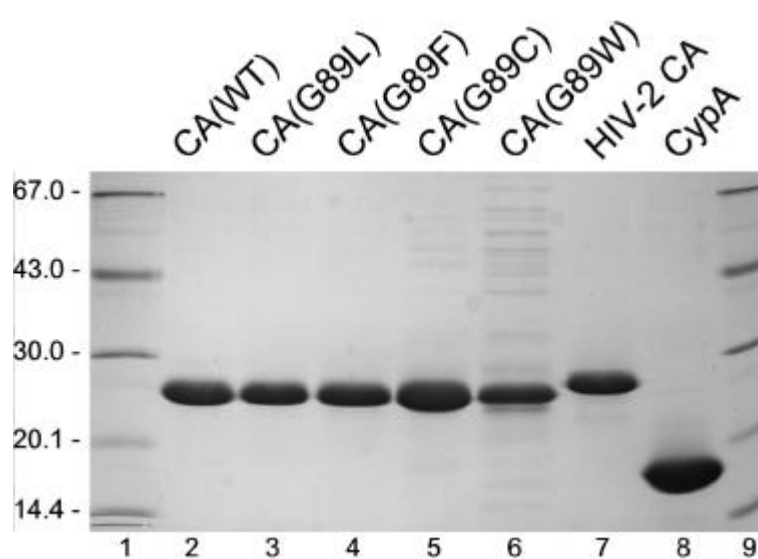


Abb. III.3: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (17.5%; 200:1) der gereinigten HIV CA Proteine. In Spur 2 ist CA(WT) (16 µg); in Spur 3, CA(G89L) (13.5 µg); in Spur 4, CA(G89F) (14.5 µg); in Spur 5, CA(G89C) (24.4 µg); in Spur 6, CA(G89W) (18.6 µg); in Spur 7, HIV-2 CA (13.5 µg); und in Spur 8, CypA (25 µg) gezeigt. Molekulargewichtsmarker sind in Spuren 1 und 9 aufgetragen und auf der linken Seite gekennzeichnet (in kD).

CypA wurde durch Induktion des Expressionsvektors pET-CypA hergestellt und wie unter II.3.3.9 beschrieben von den verunreinigenden *E.coli* Proteinen mit einem Reinheitsgrad >98% isoliert (Abb. III.3, Spur 8). Für die Konstruktion von pET-CypA wurde die kodierende Sequenz aus dem Plasmid pGEX2T/hu-cyclophilin A (Billich *et al.*, 1995) mittels PCR amplifiziert und über die eingeführten Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* in pET 11c kloniert.

Um zu prüfen, ob die Aminosäureaustausche tatsächlich zu einer Affinitätsminderung gegenüber CypA geführt hatten, wurden mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz Spektroskopie (SPR) die Dissoziationskonstanten (K_d) der verschiedenen CypA/CA Komplexe bestimmt. Diese Methode wurde bereits 1997 von Yoo *et al.* zur Quantifizierung von CypA/CA Wechselwirkungen eingesetzt und durch den Vergleich mit Daten, welche aus isothermalen titrationskalorimetrischen (ITC) Messungen für das gleiche System gewonnen worden waren, validiert (Yoo *et al.*, 1997). Für die

SPR-Analyse wurden zunächst alle CA kodierenden Sequenzen über *NdeI* und *BamHI* in einen von dem pGEX2T Vektor (Pharmacia, Freiburg i.Br.) abgeleiteten Vektor kloniert. Der Vektor enthält eine zusätzliche *NdeI*-Schnittstelle ohne Leserasterverschiebung (Yoo *et al.*, 1997). Dadurch konnten die verschiedenen CA Gene als GST-CA Fusionsproteine exprimiert und direkt aus *E.coli* Lysaten an der anti-GST-Sensoroberfläche immobilisiert werden. Verfolgt wurde dann ihre Interaktion mit in Lösung befindlichem, gereinigtem CypA. Die gewonnenen SPR Daten wurden basierend auf einem Bindungsmodell mit 1:1-Stöchiometrie angepaßt. Diese Messungen und Auswertungen wurden von K. Stray und D. Myszka (aus dem Labor von W. Sundquist) durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Tab. III.1 zusammengefaßt.

CA-Protein	K_d (μ M)	Abnahme in
	CypA Bindungsaffinität	% ^a
CA(WT)	30 (\pm 1)	
CA(G89L)	1823 (\pm 55)	60
CA(G89F)	386 (\pm 85)	13
CA(G89C)	1457 (\pm 415)	49
CA(G89W)	1890 (\pm 74)	63
HIV-2 CA	2124 (\pm 95)	71

Tab. III.1: Affinität von CypA gegenüber nativem und mutierten CA Proteinen. Alle Daten wurden durch Oberflächenplasmonresonanz Spektroskopie generiert. GST-CA Fusionsproteine wurden direkt über ihre GST/anti-GST-Interaktion an die Sensoroberfläche gebunden. Bindungsstudien wurden anschließend mit gereinigtem und gelöstem CypA durchgeführt. Die Standardabweichungen sind in Klammern angegeben. Sie wurden aus den Anpassungen der einzelnen Bindungsexperimente abgeleitet.

^aDie Abnahme in % ist die Reduktion der CypA Bindungsaffinität relativ zu dem parallel ermittelten Wert der wildtyp GST-CA/CypA Interaktion.

Für die Wildtyp-GST-CA/CypA Interaktion wurde ein K_d -Wert von 30 μ M ermittelt. Er ist etwas höher als der bereits für diesen Komplex publizierte Mittelwert von 15 \pm 5 μ M (Yoo *et al.*, 1997), liegt aber noch immer innerhalb der für wildtyp CA beobachteten experimentellen Schwankungsbreite (W. Sundquist, persönliche Kommunikation). Aufgrund der starken Affinitätsabnahme konnten die CA Varianten nicht nahe der Sättigungsbedingungen für die Bindung gemessen werden. Daher sind die Bindungskonstanten für diese Proteine mit größeren Fehlern behaftet. Der höchste K_d -Wert von ~2 mM wurde, in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß HIV-2 Virionen kein CypA enthalten (Franke *et al.*, 1994), für die CypA/HIV-2 CA Interaktion bestimmt (Tab. III.1). Für die veränderten HIV-1 CA Proteine G89W, G89L und G89C wurden vergleichbar geringe Affinitäten gegenüber CypA bestimmt.

Die CA Variante G89F hingegen war nicht ganz so stark in ihren CypA Bindungsfähigkeiten beeinträchtigt. Ihr K_d -Wert war nur 13fach gesteigert, verglichen mit der 70fachen Steigerung im Fall von HIV-2 CA (Tab. III.1). Aufgrund ihrer großen Unterschiede in CypA-Bindungsaffinitäten bezogen auf die Affinität von wildtyp HIV-1 CA zu CypA, eignen sich die CA-G89 Varianten für die Untersuchung der Effekte, die CypA auf die *in vitro* Assemblierung von CA ausübt.

III.1.2 *In vitro* Assemblierung der verschiedenen CA Proteine

Die gereinigten CA Proteine (wildtyp HIV-1 und HIV-2 CA, sowie die G89 Varianten; siehe III.1.1 und Abb. III.3) mußten auf ihre *in vitro* Assemblierungseigenschaften getestet werden. Dazu wurden konzentrierte Proteinlösungen (2 mg/ml) gegen Assembly-Puffer (1 M NaCl, pH 8.0) dialysiert (siehe II.3.2.4), die gebildeten Partikel einer Negativfärbung unterzogen und elektronenmikroskopisch analysiert (siehe II.4.1).

Wie bereits beschrieben (Gross *et al.*, 1997), bildete HIV-1 CA reproduzierbar hohle Röhren mit heterogenen Längen, die eine starke Aggregationstendenz aufwiesen (Abb. III.1). Alle G89 Varianten lagerten sich zu Strukturen mit sehr ähnlicher Morphologie zusammen, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz (Abb. III.1). Die Proteine CA(G89L) und CA(G89F) assemblierten genauso effizient wie das Wildtyp-Protein. Der Austausch von G89 zu Tryptophan oder Cystein dagegen beeinträchtigte die geordnete *in vitro* Multimerisierung sehr stark. Selbst bei Proteinkonzentrationen, die im Fall des wildtyp Proteins zur Bildung großer Mengen von Zylindern führten, wurden für diese Varianten nur vereinzelte und kurze Röhren gefunden (Abb. III.1). Um unproduktiven inter- und intramolekularen Disulfidverknüpfungen vorzubeugen, die möglicherweise zur Anhäufung irreversibler Aggregate oder falsch gefalteter Proteine führen könnten, wurde die Assemblierung von CA(G89C) in Gegenwart von 50 mM DTT durchgeführt. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Effizienz der Strukturbildung festgestellt werden.

Auch für CA(G89W) könnte unproduktive Aggregation der Grund für den Verlust der Assemblierungsfähigkeit sein. Im Gegensatz dazu verminderte der Austausch von G89 zu den großen, hydrophoben Resten Phenylalanin oder Leucin weder die Anzahl noch die Länge der *in vitro* gebildeten Zylinder. Als einzige Unterschiede wurden eine größere Variabilität im Durchmesser der Röhren, sowie eine kleine Verschiebung von dessen Mittelwert festgestellt.

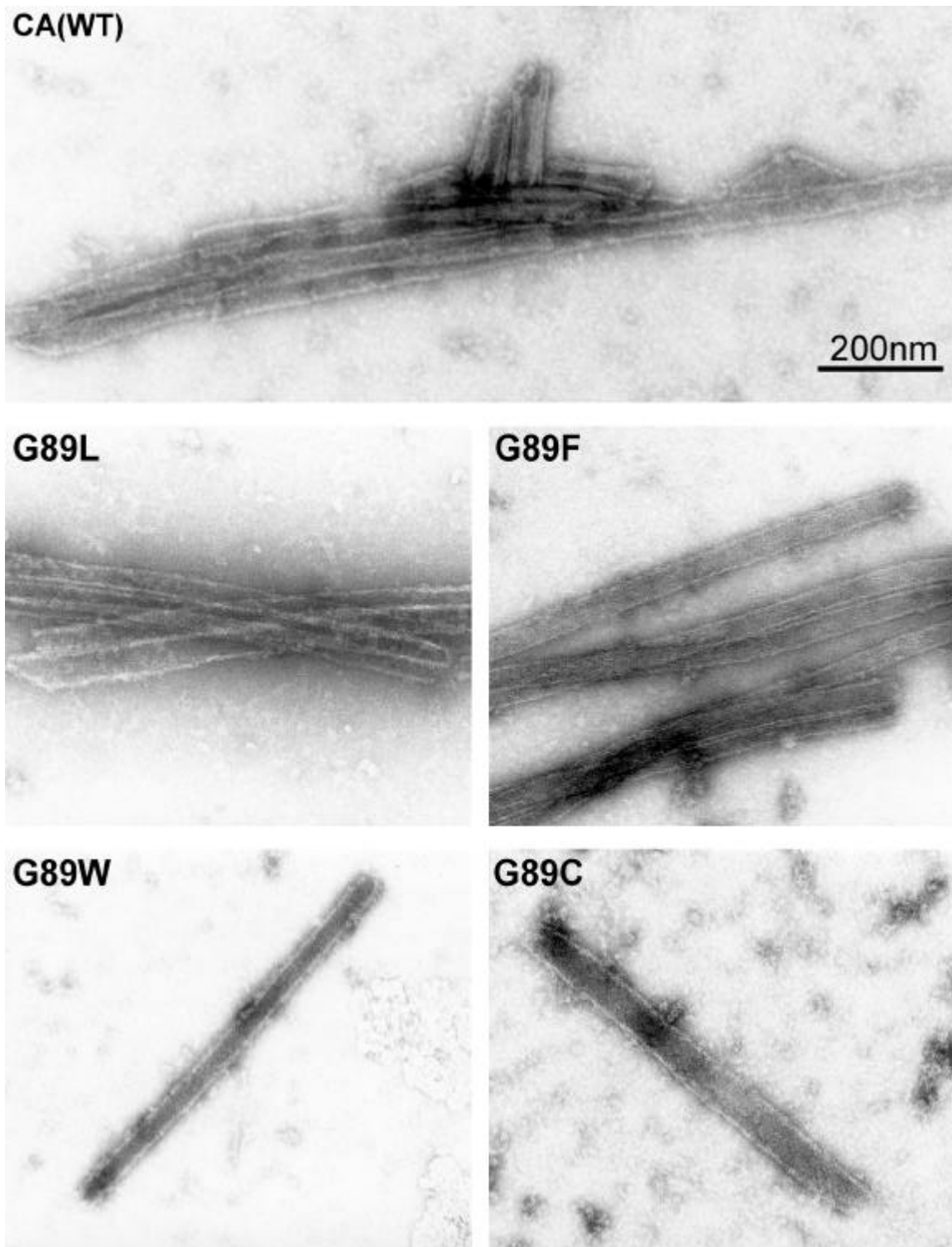


Abb. III.1: Produkte der in vitro Assemblierung von wildtyp und veränderten HIV-1 CA Proteinen. Proteinlösungen (2 mg/ml, oder 2.9 mg/ml im Fall von G89F) wurden über Nacht gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM DTT (oder 50 mM im Fall von G89C) und 1 M NaCl dialysiert und nach Negativfärbung mit 2% Uranylacetat elektronenmikroskopisch analysiert. Alle Bilder haben die gleiche Vergrößerung.

Die Durchmesser der wildtyp CA Tubuli lagen in einem Bereich zwischen 40 und 50 nm (Mittelwert: 45 nm). Röhren der Variante CA(G89L) hatten hingegen etwas größere Durchmesser (bis zu 60 nm; Mittelwert: 50 nm) und die Tubuli von CA(G89F), mit einem Mittelwert von 40 nm, etwas kleinere. Auch in den Fällen von CA(G89C) und CA(G89W) wurde eine stärkere Größenvariabilität beobachtet. Aufgrund der geringen Anzahl an Zylindern dieser Varianten insgesamt war jedoch keine statistische Auswertung der Durchmesser-Verteilung möglich. Vermutlich sind die Unterschiede in den Durchmessern auf Effekte zurückzuführen, die durch die Negativfärbung verursacht wurden, da ungefärbte wildtyp CA- und CA(G89F)-Röhren in cryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen eine ähnliche Durchmesser-Verteilung aufwiesen.

Im Gegensatz zu den CA Proteinen von HIV-1 multimerisierte CA aus HIV-2 nicht zu räumlich geordneten Partikeln *in vitro*. Es bildeten sich vorwiegend unregelmäßige, vermutlich eher zweidimensionale, fädige Strukturen (Abb. III.2, A). Die vereinzelt Zylinder waren in ihrem Durchmesser sehr variabel (Abb. III.2, B).

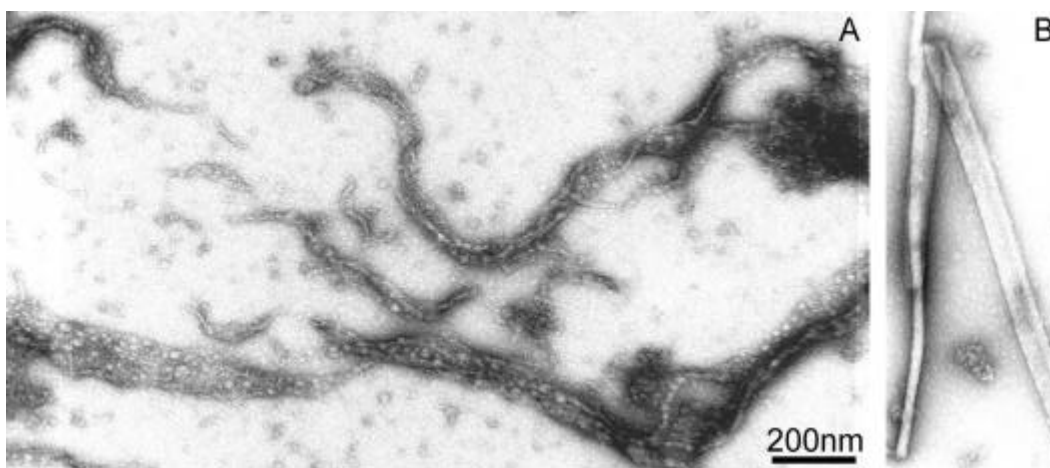


Abb. III.2: In vitro Assemblierung von HIV-2 CA. 5.0 mg/ml HIV-2 CA wurden über Nacht gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM DTT und 1 M NaCl dialysiert und nach Negativfärbung mit 2% Uranylacetat elektronenmikroskopisch analysiert. Beide Bilder haben die gleiche Vergrößerung.

Auch unter Variation der Dialysebedingungen, die in der nachfolgenden Tabelle (Tab. III.1) zusammengefaßt sind, konnten keine Konditionen für HIV-2 CA gefunden werden, welche die Bildung tubulärer Strukturen, analog zu den HIV-1 CA Zylindern, förderten.

pH-Wert	Proteinkonzentration (mg/ml)	NaCl-Konzentration (M)
6.3	5.0	0.1 / 0.5 / 1
8.0	1.0	0.1 / 0.5 / 0.75 / 1
	3.0	0.1 / 0.5 / 0.75 / 1
	7.3	0.1 / 0.5 / 0.75 / 1
	11.6	0.1 / 0.5 / 0.75 / 1
8.2	5.0	0.1 / 0.5 / 1
9.0	1.0	0.1 / 0.5 / 0.75 / 1
	3.0	0.1 / 0.5 / 0.75 / 1
	7.3	0.1 / 0.5 / 0.75 / 1
	11.6	0.1 / 0.5 / 0.75 / 1 und 1 M KCl

Tab. III.1: Getestete Dialysebedingungen für HIV-2 CA.

Alle Varianten von HIV-1 CA waren also dazu in der Lage sich *in vitro* zu tubulären Strukturen zusammenzulagern, wenngleich mit stark unterschiedlicher Effizienz. Für CA aus HIV-2 hingegen konnte trotz seiner 70.5%igen Aminosäuresequenzidentität zu HIV-1 CA die Multimerisierung in geordnete Partikel nicht induziert werden.

III.1.3 Einfluß von CypA auf das *in vitro* Assembly von CA Proteinen

Um zu untersuchen welchen Effekt CypA auf die *in vitro* Assemblierung von CA Proteinen ausübt, wurden die Reaktionen in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen an gereinigtem CypA durchgeführt (siehe III.1.1) (Abb. III.1).

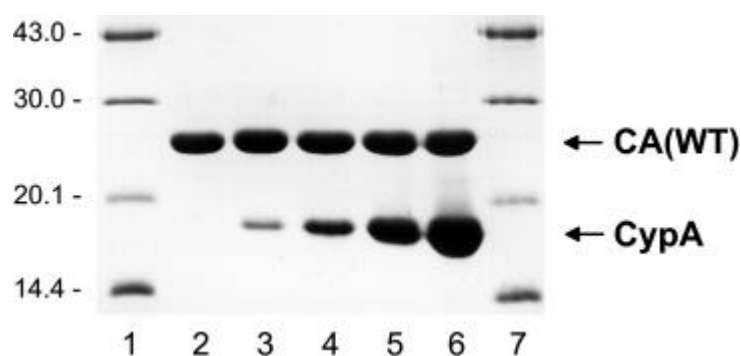


Abb. III.1: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der einzelnen HIV-1 CA(WT) Multimerisierungsreaktionen mit unterschiedlichen relativen Mengen an CypA. CA Konzentrationen wurden auf 78.1 μ M (entspricht 2 mg/ml) konstant gehalten, während die CypA Konzentrationen verändert wurden: kein CypA (Spur 2); 7.81 μ M (entspricht einem molaren Verhältnis von CypA/CA von 1:10; Spur 3); 26.0 μ M (1:3; Spur 4); 78.1 μ M (1:1; Spur 5); oder 234.3 μ M (3:1; Spur 6). 5 μ l dieser Reaktionsansätze wurden aufgetragen (entspricht je 10 μ g CA). Molekulargewichtsmarker sind in Spuren 1 und 7 aufgetragen und auf der linken Seite gekennzeichnet (in kD).

Dabei wurde wildtyp HIV-1 CA mit CA(G89L) verglichen, da diese Variante, wie auch CA(G89F), völlig unbeeinträchtigt in ihrer Assemblierungseffizienz ist. Im Gegensatz zu CA(G89F) ist die Variante CA(G89L) jedoch in ihrer Affinität gegenüber CypA stärker reduziert. Multimerisierungsprodukte von wildtyp HIV-1 CA, die in Anwesenheit von CypA gebildet wurden, waren weder in ihrer Morphologie noch in ihrem Durchmesser, oder ihrer Wandstärke verändert. Beeinflusst war allerdings die Effizienz der Strukturbildung und das Aggregationsverhalten der Zylinder. Bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (CypA/CA), entsprechend der im Virus vorherrschenden Konzentrationsverteilung, formierten sich im Fall von HIV-1 CA signifikant längere Röhren, deren Aggregationstendenz unterdrückt war (Abb. III.2, A). Auf die Assemblierung von CA(G89L) übte CypA bei dem selben molaren Verhältnis keinen sichtbaren Effekt aus (Abb. III.2, E). Die CA(G89L) Zylinder waren bis zu einem molaren Verhältnis von 1:3 (CypA/CA) miteinander aggregiert (Abb. III.2, F). Erst bei äquimolaren Bedingungen konnte sowohl eine Vereinzelung der Tubuli, als auch ihre Verlängerung beobachtet werden (Abb. III.2, G). Im Gegensatz dazu wurden für das Wildtyp-Protein in Anwesenheit von äquimolaren CypA Konzentrationen die Bildung von nur wenigen, kurzen Zylindern beobachtet (Abb. III.2, C). Wurde die CypA Konzentration bis zu einem molaren Verhältnis von 3:1 (CypA/CA) gesteigert, konnten im Fall von wildtyp CA weder Tubuli, noch irgendwelche anderen organisierten Strukturen gefunden werden (Abb. III.2, D). Die in ihrer Affinität gegenüber CypA reduzierte Variante CA(G89L) jedoch, war selbst bei dreifachem molaren Überschuß an CypA noch in der Lage, sich zu tubulären Strukturen zusammenzulagern (Abb. III.2, H). CypA übt also die gleichen Effekte auf die *in vitro* Assemblierung der beiden Proteine aus, allerdings ist das Wirkungsspektrum von CypA gegenüber der CA(G89L)-Variante zu ca. 10fach höheren CypA-Konzentrationen verschoben. Die Korrelation zwischen den für die Proteine bestimmten Affinitäten gegenüber CypA (Tab. III.1) und dessen Einfluß auf die Strukturbildung *in vitro* (Abb. III.2), lassen den Schluß zu, daß die beobachteten Effekte auf die direkte Bindung von CypA an CA zurückzuführen sind.

Auch die anderen CA G89-Varianten wurden in Gegenwart von CypA bezüglich ihres Assemblierungsphänotyps untersucht. Im Fall von CA(G89F) wurden die gleichen Ergebnisse, wie bereits für CA(G89L) beschrieben, erzielt (Daten nicht gezeigt), obwohl sich diese beiden Varianten um ein Fünffaches in ihren Affinitäten gegenüber CypA unterscheiden (Tab. III.1). CA(G89C) änderte sein Assemblierungsverhalten auch bei CypA Zugabe nicht (Daten nicht gezeigt) es war also weiterhin extrem ineffizient in seiner Strukturbildung.

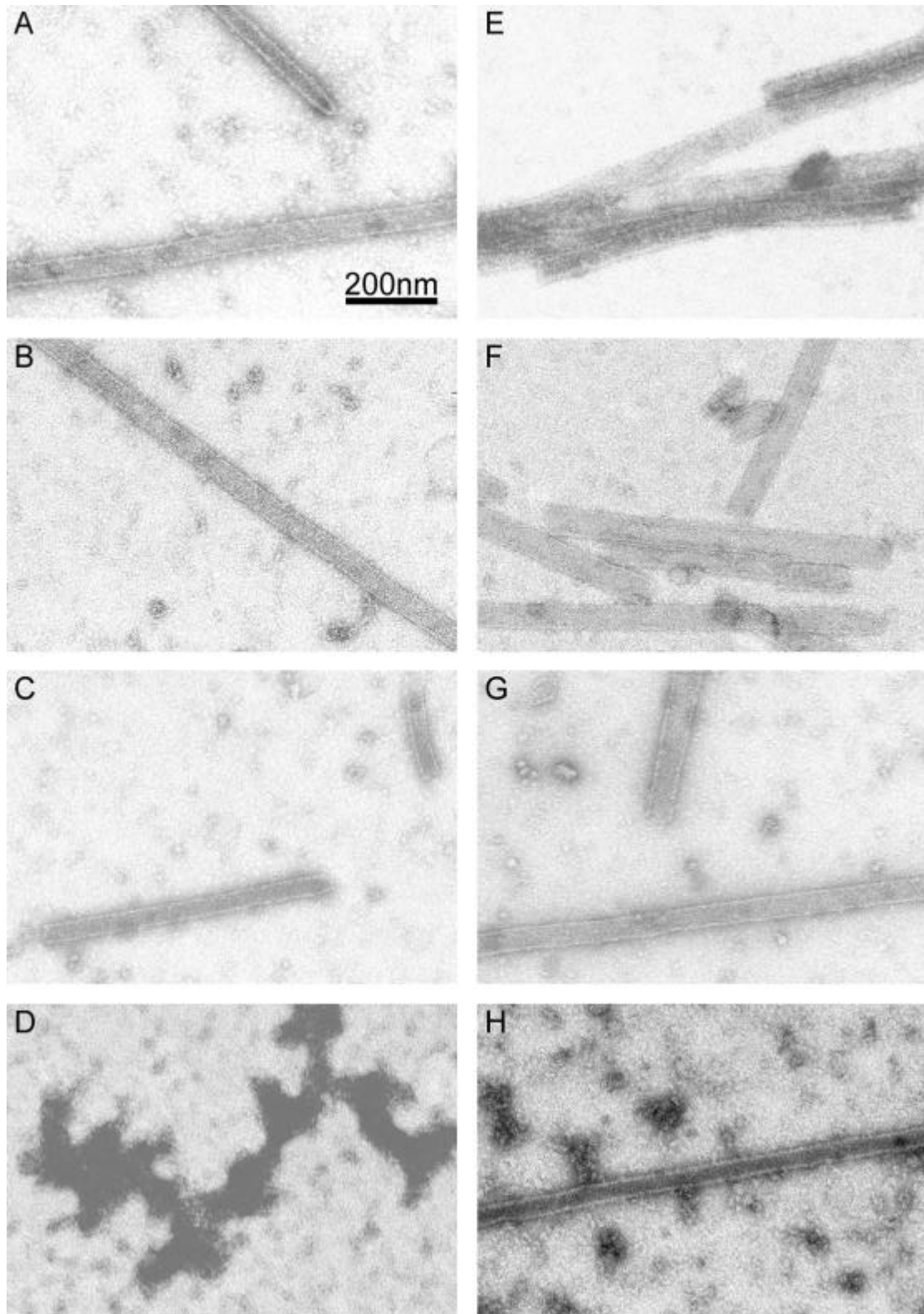


Abb. III.2: Effekt von CypA auf die in vitro Assemblierung von CA(WT) und CA(G89L). Negativ gefärbte elektronenmikroskopische Aufnahmen, welche die Produkte der in vitro Multimerisierung von CA(WT) (A-D) oder CA(G89L) (E-H) in Gegenwart von gereinigtem CypA und molaren Verhältnissen von 1:10 (CypA/CA, A und E), 1:3 (B und F), 1:1 (C und G), oder 3:1 (D und H) zeigen. Die Reaktion der CA Selbstassoziation wurde wie in Abb. III.1 durchgeführt. Alle Bilder haben die gleiche Vergrößerung.

Im Gegensatz dazu steigerte die Anwesenheit von CypA im Reaktionsansatz die Bildung von geordneten Zylindern im Fall der ebenfalls ineffizient assemblierenden

Variante CA(G89W). Bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (CypA/CA) multimerisierte CA(G89W) zu einer signifikant größeren Anzahl aber noch immer kurzen Zylindern (Abb. III.3, A). In Anwesenheit von äquimolaren Mengen an CypA/CA bildeten sich längere Zylinder (Abb. III.3, B). Trotz der hohen, für den CypA/CA(G89W)-Komplex bestimmten, Dissoziationskonstante von $1890\ \mu\text{M}$ übte CypA also einen positiven Effekt auf die *in vitro* Multimerisierung der W89-Variante aus. Die Dissoziationskonstante von HIV-2 CA liegt mit $2124\ \mu\text{M}$ in einem vergleichbaren Größenbereich. Obwohl HIV-2 CypA *in vivo* nicht in das Virion einbaut, wurde getestet, ob sich die Zugabe von CypA auf die *in vitro* Assemblierungsreaktion von HIV-2 CA auswirkt. Allerdings konnten weder bei einem molaren Verhältnis von 1:10, 1:1, noch 3:1 (CypA/CA) Unterschiede in Multimerisierungseffizienz oder Morphologie der Strukturen festgestellt werden. HIV-2 CA bildete nach wie vor nur unregelmäßige, fädige Strukturen (Daten nicht gezeigt).

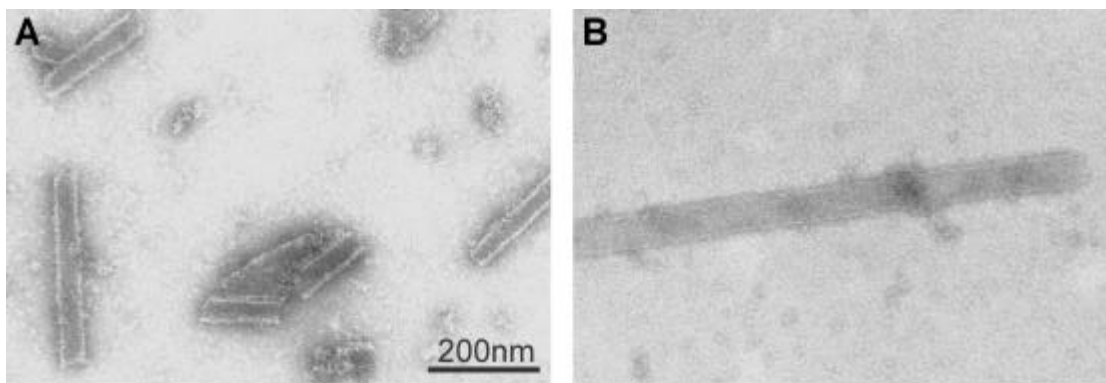


Abb. III.3: Effekt von CypA auf die *in vitro* Assemblierung von CA(G89W). Negativ gefärbte elektronenmikroskopische Aufnahmen, welche die Produkte der *in vitro* Multimerisierung von CA(G89W) in Gegenwart von gereinigtem CypA bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (CypA/CA) (A) bzw. 1:1 (B). Die Reaktion der CA Selbstassoziation wurde wie in Abb. III.1 durchgeführt. Beide Bilder haben die gleiche Vergrößerung.

III.1.4 Cryo-Elektronenmikroskopischer Vergleich von CA-Zylindern mit und ohne CypA

Um festzustellen, ob CypA kleine Änderungen in der Organisation der Zylinder induziert, wurden die Produkte der *in vitro* Multimerisierungsreaktionen cryoelektronenmikroskopisch (von Dennis Thomas im Labor von Stephen Fuller) untersucht. Diese Methode läßt die direkte Analyse ungefärbter Zylinder in ihrer nativen Form zu, da auf Kontrastmittel verzichtet werden kann. Auch Fixierung und Dehydrierung werden vermieden. Die Strukturen werden durch Phasenkontrastverschiebung visualisiert, wodurch eine Projektion des gesamten Zylinders entsteht. In Abb. III.1 (links) sind cryoelektronenmikroskopische Bilder von

wildtyp CA Zylindern zu sehen, welche in Ab- (Abb. III.1, A) oder Anwesenheit (Abb. III.1, B) von CypA assembliert wurden.

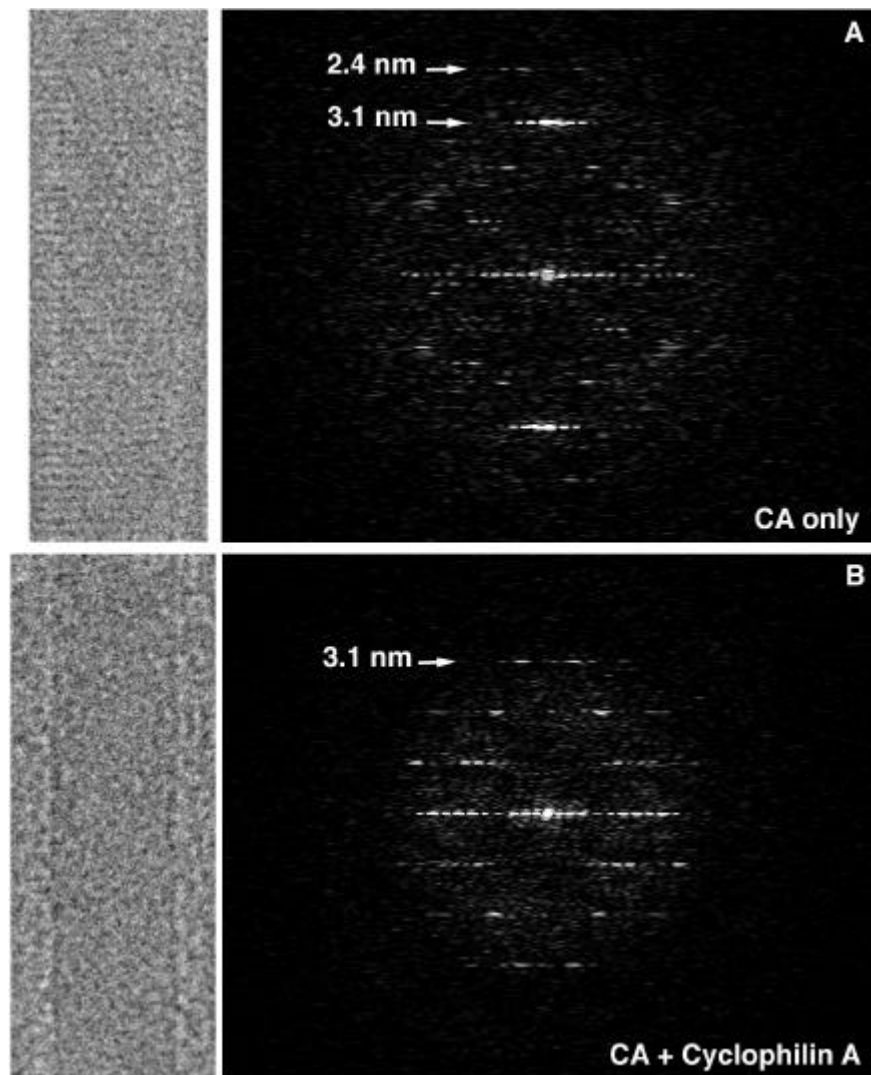


Abb. III.1: Cryoelektronenmikroskopische Aufnahmen (links) und die daraus abgeleiteten Streumuster (rechts) von CA(WT)-Zylindern welche in An- oder Abwesenheit von CypA multimerisiert wurden. (Oben) Ohne CypA generierter CA-Zylinder mit der „layerline“ höchster Auflösung bei 2.4 nm. Insgesamt sind einschließlich des Äquators (A, mitte), 15 „layerlines“ sichtbar (A). (Unten) CA-Zylinder generiert in Gegenwart von CypA bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (CypA/CA). Es sind mit Äquator (B, mitte) nur 4 „layerlines“ erkennbar (B). Zur Berechnung der Streumuster wurde von Ausschnitten identischer Länge (300 nm) ausgegangen. Diese Abbildung wurde von D. Thomas und S. Fuller zur Verfügung gestellt.

Fouriertransformation dieser Primärbilder lieferte die dazugehörigen berechneten Streumuster, welche in Abb. III.1 (rechts) gezeigt sind. Das Auftreten sog. „layerlines“ ist ein Zeichen für die helikale Organisation der Zylinder (Moody, 1990). Zylinder, die in Gegenwart der im Virus vorliegenden stöchiometrischen Mengen an CypA (CypA/CA von 1:10) gebildet wurden, streuten bis zu einer „layerline“ von 3.1 nm (Abb. III.1, B). Im Streumuster eines typischen CA Zylinders, welcher ohne CypA assembliert wurde, war die 3.1 nm „layerline“ wesentlich stärker ausgeprägt und zusätzlich wurden weiter außerhalb liegende „layerlines“ z.B.: bei 2.4 nm sichtbar

(Abb. III.1, A). Die CA-Zylinder streuten also zu einer höheren Auflösung und weisen folglich eine stärker geordnete lokale Struktur auf. Insgesamt waren in den Streumustern von CA-Zylindern 15 „layerlines“ zu sehen, in den von CA-Zylindern mit CypA jedoch nur 4. Auch dieser Befund weist darauf hin, daß die Anwesenheit von CypA lokale Unordnung induziert, während die globale Organisation der Röhren intakt bleibt.

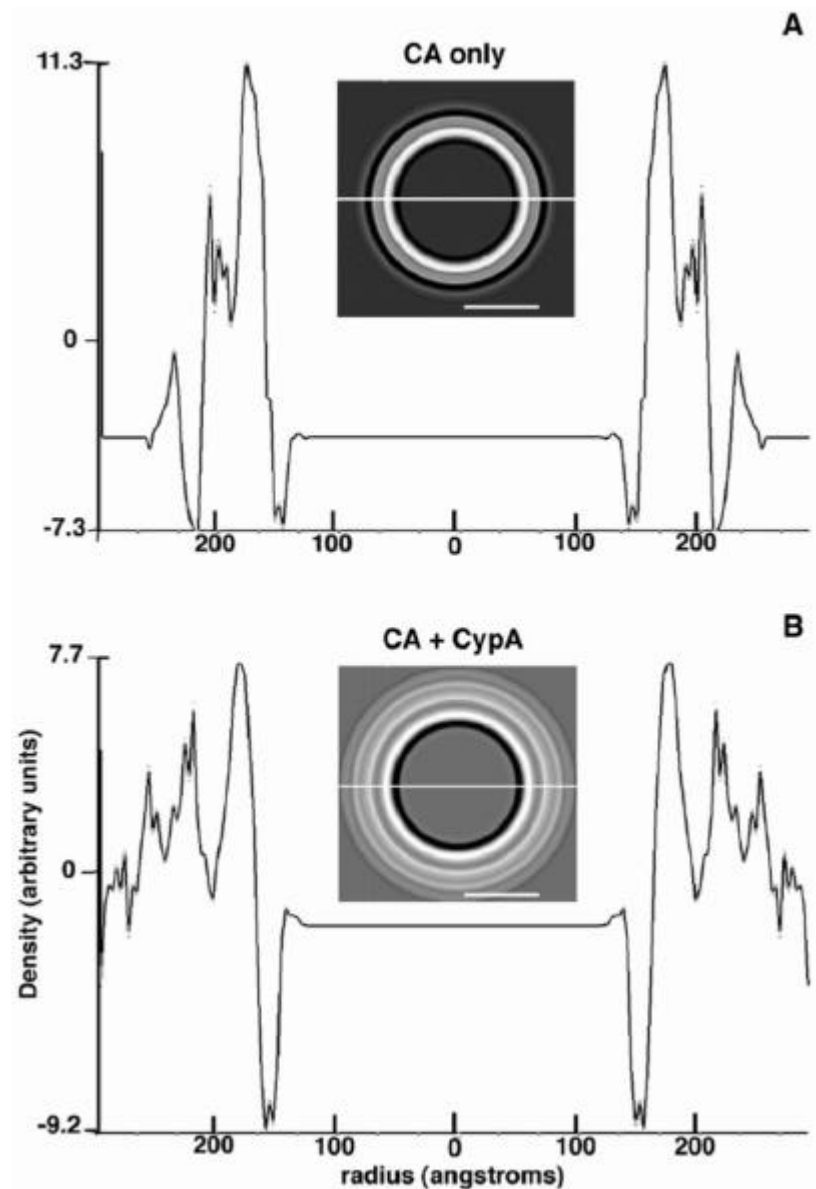


Abb. III.2: Radiale Dichteverteilung der in Abb. III.1 gezeigten Zylinder, welche entweder in Ab- (A) oder Anwesenheit (B) von CypA (1:10, CypA/CA) generiert wurden. Für die Rekonstruktion der Dichteverteilung wurden die Äquatoren der berechneten Streumuster der jeweiligen Zylinder aus Abb. III.1 verwendet. Ein rechtwinklig zur Zylinderachse stehender Ausschnitt ist gezeigt (kleines Bild), wobei Regionen hoher Dichte (Protein) in weiß und Regionen geringer Dichte in schwarz dargestellt sind. Die Dichteprofile wurden von einer Linie quer durch das Zentrum einer jeden Rekonstruktion abgeleitet (weiße Linie). Die Zentren der Profile wurden zur Entfernung des Untergrunds maskiert. Diese Abbildung wurde von D. Thomas und S. Fuller zur Verfügung gestellt.

Um den Aufbau der *in vitro* assemblierten Zylinder weiter zu untersuchen und um CypA innerhalb der Tubuli lokalisieren zu können, wurden radiale Dichteprofile erstellt (von Dennis Thomas im Labor von Stephen Fuller). Die „layerline“, die das Streumuster in der Mitte unterteilt, auch Äquator genannt, enthält Informationen über die radiale Dichteverteilung innerhalb der Struktur. Sie kann daher dazu benutzt werden, die durchschnittliche Dichteverteilung eines im rechten Winkel zur Zylinderachse stehenden Zylinderquerschnitts zu rekonstruieren. In Abb. III.2 sind die Rekonstruktionen für Zylinder zu sehen, welche in Ab- (Abb. III.2, A) oder Anwesenheit (Abb. III.2, B) von CypA gebildet wurden. Aus einem Querschnitt durch ihre Mitte (weiße Linie) wurden die ebenfalls in Abb. III.2 dargestellten radialen Dichteprofile berechnet. Man erkennt die geschichtete Architektur der CA-Zylinder, bestehend aus zwei Dichtemaxima. Sie können vermutlich der C-terminalen Domäne im Röhreninneren und der nach außen orientierten N-terminalen Domäne von CA zugeordnet werden (Abb. III.2, A). CypA enthaltende Zylinder haben eine, an der Außenseite aufgelagerte, zusätzliche Lage an Masse (Abb. III.2, B), welche wahrscheinlich durch die Bindung von CypA an die Zylinderoberfläche entsteht. Betrachtet man die Rekonstruktionen der Dichteverteilung, ist des weiteren auffällig, daß nur die CA-Zylinder ohne CypA einen inneren und äußeren dunklen Rand aufweisen. Zylindern die in Gegenwart von CypA assembliert wurden, fehlt der äußere dunkle Ring. Diese dunklen Ränder entstehen durch den Prozeß der Phasenkontrastverschiebung an scharfen Grenzen zwischen der Struktur und dem umgebenden Medium. Dies deutet darauf hin, daß die innere Domäne in beiden Zylindern fest geordnet ist, jedoch die äußere Domäne in dem CypA enthaltenden Zylinder weniger gut definiert vorliegt.

III.1.5 Effekt von CypA auf bereits gebildete CA-Zylinder

Bisher wurde CypA eine auf das reife Kapsid destabilisierende Wirkung zugeschrieben, welche das Kapsid dazu befähigt, nach Eintritt in die Zielzelle auseinanderzufallen (Braaten *et al.*, 1996; Gamble *et al.*, 1996). Daher war es von Interesse, ob präassemblierte Zylinder durch CypA Zugabe dissoziiert werden können. Es wurden dazu Multimerisierungsreaktionen mit wildtyp CA und CA(G89L) durchgeführt und anschließend unterschiedliche Konzentrationen an CypA zugegeben. Bei substöchiometrischer CypA Zugabe wurden kaum elektronenmikroskopisch sichtbare Effekte beobachtet, deshalb wurde der zeitliche Verlauf der Reaktion bei einem molaren Verhältnis von 3:1 (CypA/CA) verfolgt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und nach Negativfärbung elektronenmikroskopisch analysiert (Abb. III.1).

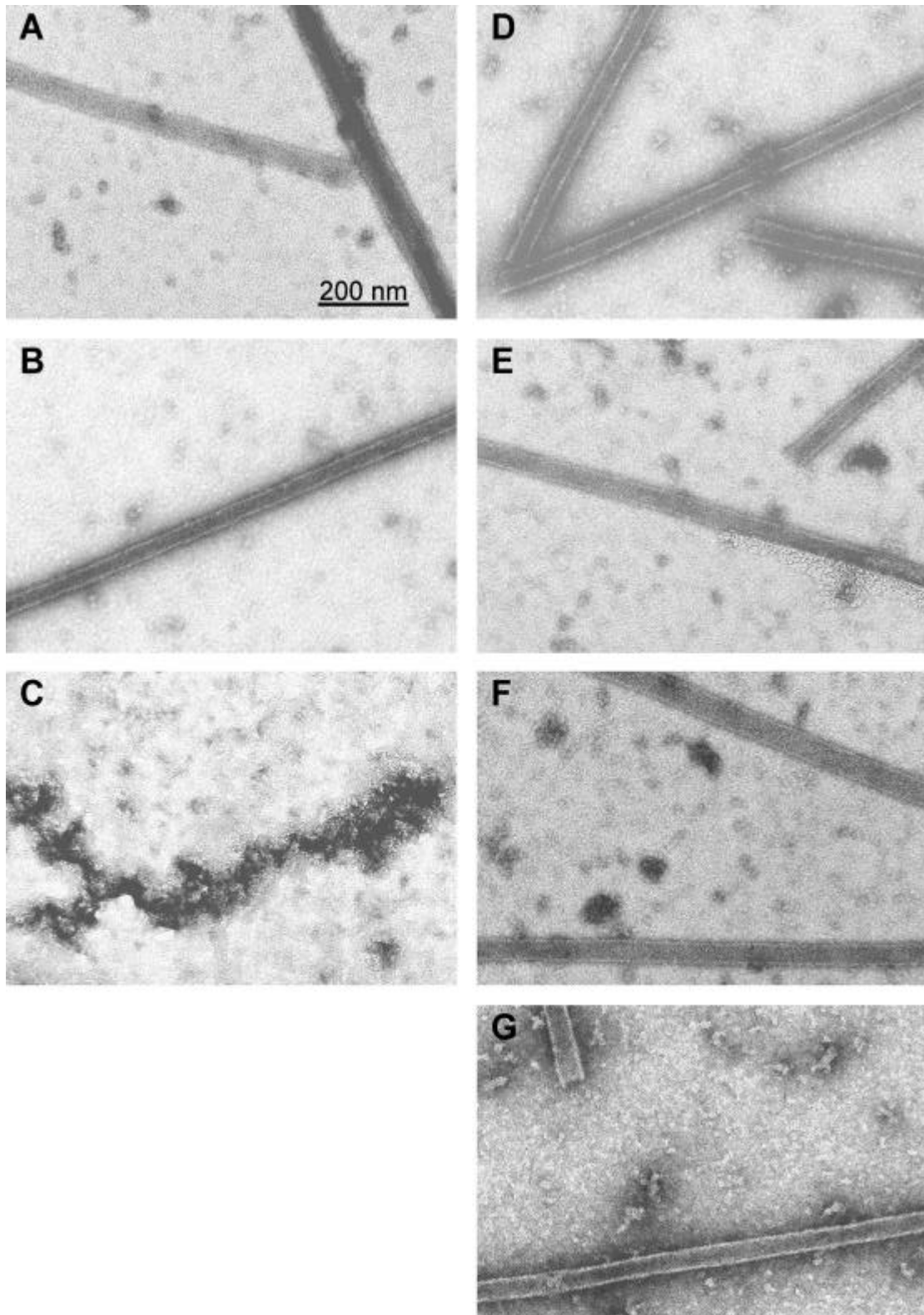


Abb. III.1: Zeitlicher Verlauf der CypA-induzierten Effekte auf in vitro gebildete CA(WT) und CA(G89L) Zylinder. Die Multimerisierungsreaktionen für CA(WT) (A-C) und CA(G89L) (D-G) wurden wie in Abb. III.1 durchgeführt. Danach wurden die Assemblierungsprodukte in einem molaren Verhältnis von 3:1 (CypA/CA) mit CypA versetzt und bei 4°C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten, nämlich nach 15 min (A und D), 1 h (B und E), 4 h (C und F) und 28 h (G) wurden Aliquots entnommen und nach Negativfärbung elektronenmikroskopisch analysiert. Alle Bilder haben die gleiche Vergrößerung.

Vor CypA Zugabe wurden viele miteinander aggregierte Zylinder entdeckt (Abb. III.1). Bereits 15 Minuten nach CypA Zugabe trennten sich die CA(WT), sowie CA(G89L)-Zylinder voneinander (Abb. III.1, A und D). Nach einer Stunde wurden keine weiteren Effekte beobachtet (Abb. III.1, B und E), jedoch waren die wildtyp CA-Zylinder nach vierstündiger Inkubation mit CypA komplett dissoziiert (Abb. III.1, C). Im Gegensatz dazu blieben die Zylinder der Variante G89L sogar 28 h nach CypA Zugabe stabil (Abb. III.1, G). Dies bedeutet, daß CypA zwei Funktionen ausübt: Die erste und schnelle Reaktion verläuft unabhängig von den Dissoziationskonstanten der Proteine und führt zur Vereinzelung der gebildeten Röhren. Zweitens induziert CypA eine, mit den Dissoziationskonstanten der entsprechenden Proteine korrelierende, sehr langsame Dissoziation der *in vitro* assemblierten Zylinder.

III.2 Strukturbildungseigenschaften von HIV-1 und HIV-2 CA-NC

1997 konnte in unserem Labor gezeigt werden, daß eine C-terminale Verlängerung des CA Proteins aus HIV-1 um die im Vorläuferprotein Gag daran angrenzenden Domänen SP1, NC und SP2 die Effizienz der *in vitro* Multimerisierung steigert (Gross *et al.*, 1997). CA-NC-SP2 lagert sich im Vergleich zu CA schon bei 20fach niedrigeren Proteinkonzentrationen und physiologischen Salzbedingungen zu morphologisch sehr ähnlichen, zylindrischen Strukturen zusammen, allerdings nur im Beisein einzelsträngiger Nukleinsäuren. Dieser Befund steht in Einklang mit den von Campbell und Vogt publizierten Daten, die bereits 1995 die Nukleinsäureabhängigkeit für die *in vitro* Assemblierung der CA-NC Proteine von RSV und HIV-1 beobachteten (Campbell & Vogt, 1995). Daraus leiteten die Autoren ein Modell für die Multimerisierung retroviraler Strukturproteine ab, wonach sich zunächst die einzelnen Gag-Polypeptide mit ihrer NC-Domäne an der Nukleinsäure wie Perlen an einer Kette aufreihen. Diese wiederum wickelt sich dann spiralförmig, stabilisiert durch Protein-Protein-Wechselwirkungen, auf und bildet auf diese Weise sphärische oder tubuläre Strukturen.

Da CA aus HIV-2 unter den getesteten Bedingungen (siehe III.1.2) nicht in der Lage war, *in vitro* hoch geordnete Strukturen, vergleichbar denen von HIV-1 CA, auszubilden, sollte geprüft werden, ob auch für dieses Protein die Effizienz der Multimerisierung durch die Verknüpfung mit der NC-Domäne und der Anwesenheit von Nukleinsäuren erhöht werden kann.

III.2.1 *In vitro* Assembly der gereinigten CA-NC Proteine

Um den Einfluß von Nukleinsäuren auf das Assemblierungsverhalten *in vitro* von HIV-2 CA-NC zu prüfen, wurde zunächst ein für dieses Protein kodierendes Expressionsplasmid hergestellt. Die Sequenz wurde ausgehend von dem HIV-2 Klon

ROD (Guyader *et al.*, 1987) mittels PCR amplifiziert. Das Startermolekül am 5'Ende war identisch mit dem der HIV-2 CA Klonierung (siehe III.1.1). Das Startermolekül am 3'Ende wurde so gewählt, daß nach dem letzten Kodon von NC zwei Stop-Kodons gefolgt von einer *Bgl*II-Schnittstelle entstanden. Das PCR-Fragment wurde mit *Bsr*GI und *Bgl*II geschnitten und in den mit *Bsr*GI und *Bam*HI verdauten pET-2CA-WT Vektor subkloniert. Es entstand das Plasmid pET-2CA-NC-WT.

Zum direkten Vergleich wurde der entsprechende Vektor für HIV-1 CA-NC-SP2 (pET-CA-NC) von Ingolf Gross übernommen (Gross *et al.*, 1997). Beide CA-NC Proteine wurden in *E.coli* BL21(DE3) Zellen exprimiert, die Zellen lysiert und deren lösliche Bestandteile einer Ammoniumsulfatpräzipitation (10%) unterzogen. Das CA-NC-haltige Präzipitat wurde gelöst, daraus restliche Nukleinsäuren entfernt und über einer Heparin-Säule von verunreinigenden Proteinen getrennt (siehe II.3.3.6). Auf Grund der hohen Affinität NC-haltiger Protein für Nukleinsäuren waren große Verluste an CA-NC während der Reinigung in unlöslichen Präzipitaten zu verzeichnen. Daher waren die Ausbeuten insgesamt gering (z.B.: aus 10 g *E.coli* Zellpellet wurden 7.8 mg HIV-1 CA-NC-SP2 gewonnen) und die Reinheitsgrade geringer als 80%. Bei CA-NC aus HIV-2 konnten auf Grund noch größerer Verluste und der außerdem niedrigen Expressionseffizienz nur sehr geringe Reinigungseffekte erzielt werden. Vermutlich ist die geringere Löslichkeit auf die Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung und das Fehlen des „Spacerpetids“ SP2 zurückzuführen.

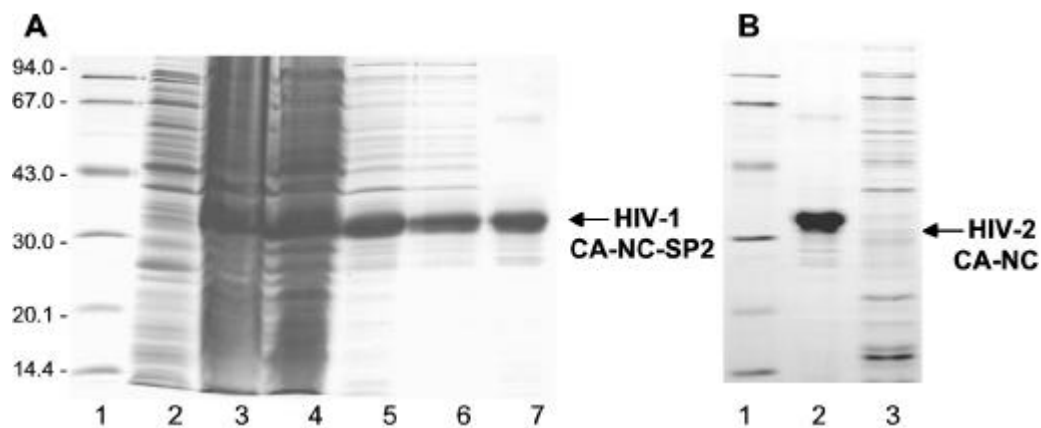


Abb. III.1: Reinigung von HIV-1 CA-NC-SP2 und HIV-2 CA-NC. A) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (17.5%; 200:1) eines Reinigungsverlaufs von HIV-1 CA-NC-SP2. Spuren: 2 und 3, Zellysate uninduzierter und induzierter Bakterien; 4, löslicher Überstand nach Zentrifugation bei 20000 rpm; 5, gelöstes Pellet der 30% Ammoniumsulfatfällung; 6, Durchfluß der HQ-anionenaustausch Chromatographie; 7, vereinte CA-NC-SP2 enthaltende Fraktionen der kationenaustauscher Chromatographie. B) Endprodukte der HIV-1 CA-NC-SP2- (Spur 2) und HIV-2 CA-NC-Reinigung (Spur 3). Beide Reinigungen wurden nach identischem Protokoll durchgeführt. Die entsprechenden Proteine sind gekennzeichnet. CA-NC von HIV-2 wurde mittels Western-Blot identifiziert. Molekulargewichtsmarker sind jeweils in der ersten Spur aufgetragen und auf der linken Seite von A) gekennzeichnet (in kD).

Der Verlauf einer HIV-1 CA-NC-SP2 Reinigung ist in Abb. III.1,A dargestellt. Abbildung Abb. III.1,B zeigt vergleichend das aus parallel durchgeführter Reinigung resultierende HIV-2 CA-NC-haltige Proteingemisch mit einer Gesamtproteinkonzentration von 0.3 mg/ml. Die CA-NC Bande wurde durch Western-Blot Analyse identifiziert (Daten nicht gezeigt).

Das HIV-2 CA-NC Proteingemisch wurde direkt in die für HIV-1 CA-NC-SP2 etablierte *in vitro* Assemblierungsdialyse eingesetzt und mit HIV-1 CA-NC-SP2 verglichen, das mit 0.5 mg/ml bzw. 0.2 mg/ml in der Dialyse vorlag. In Gegenwart eines DNA-Oligonukleotids mit einer Länge von 73 Basen unspezifischer Sequenz wurde gegen pH 8.0 und 0.1 M NaCl dialysiert. Die assemblierten Strukturen wurden nach Negativfärbung elektronenmikroskopisch untersucht. CA-NC-SP2 von HIV-1 bildete die charakteristischen tubulären Strukturen, die in ihrer Morphologie den CA-Zylindern sehr ähnlich sind (Campbell & Vogt, 1995; Gross *et al.*, 1997). Sie haben einen etwas geringeren Durchmesser von 35 bis 45 nm, aber größere Wandstärke von 12 nm (Abb. III.2, A und B), im Vergleich zu 45-55 nm und 6 nm bei CA-Zylindern. In Abb. III.2, B ist außerdem eine konusartige Struktur sichtbar, die in ihren Dimensionen dem konusförmigen Kapsid reifer Viren entspricht.

Strukturen dieser Art wurden bisher auch in *in vitro* Assemblierungsexperimenten von HIV-1 CA und HIV-1 CA-NC gefunden (Ganser *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000). *In vitro* Multimerisierung von CA-NC aus HIV-2 führte zur Bildung kurzer, röhrenartiger Strukturen, die in ihren Durchmessern, auch innerhalb eines Zylinders, sehr variabel waren. Neben diesen Strukturen wurde auch das Auftreten kleiner sphäroider Dialyseprodukte mit Durchmessern bis zu 70 nm beobachtet (Abb. III.2, C und D). Über die Effizienz der Strukturbildung von HIV-2 CA-NC Proteinen kann auf Grund der mangelhaften Reinheit des verwendeten Ausgangsmaterials keine Aussage gemacht werden. Prinzipiell vermitteln die HIV-2 CA-NC Multimerisierungsprodukte jedoch den Eindruck einer weniger definierten globalen Organisation.

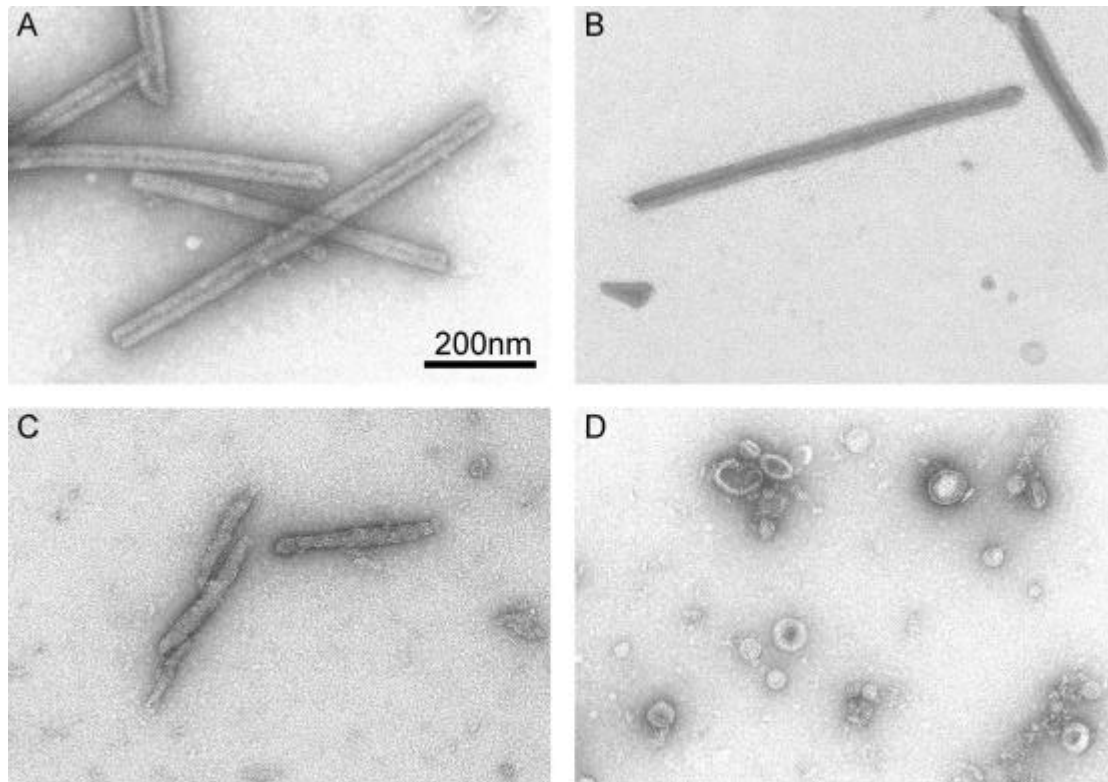


Abb. III.2: Produkte der *in vitro* Assemblierung von HIV-1 CA-NC-SP2 (A und B) und HIV-2 CA-NC (C und D). 0.5 mg/ml (A) oder 0.2 mg/ml (B) HIV-1 CA-NC-SP2 wurden über Nacht gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM DTT und 0.1 M NaCl in Gegenwart von 5% (w/w) eines 73-Basen langen DNA-Oligonukleotids dialysiert und nach Negativfärbung mit 2% Uranylacetat elektronenmikroskopisch analysiert. Das HIV-2 CA-NC enthaltende Proteingemisch wurde bei einer Gesamtproteinkonzentration von 0.3 mg/ml direkt und unter gleichen Bedingungen in die *in vitro* Multimerisierungsreaktion eingesetzt, ebenfalls negativ eingefärbt und elektronenmikroskopisch analysiert (C und D). Alle Bilder haben die gleiche Vergrößerung.

Zur besseren Vergleichbarkeit sollte die Fähigkeit zur Partikelbildung der beiden CA-NC Proteine ohne vorherige Reinigung gegenübergestellt werden. Dies sollte in einem biologischen System, also noch innerhalb der diese Proteine exprimierenden *E.coli*-Zellen geschehen.

III.2.2 Untersuchung der Strukturbildung induzierter CA und CA-NC Proteine innerhalb von *E.coli*

Gag Proteine des Mason-Pfizer monkey Virus und Fragmente des RSV, oder HIV-1 Gag-Polypeptides lagern sich nach Expression in *E.coli* noch innerhalb der Bakterienzellen zu sphärischen oder tubulären Partikeln zusammen. Diese entsprachen in der Regel ihren jeweiligen Phänotypen nach *in vitro* Multimerisierung (Campbell & Vogt, 1997; Gross *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 2000; Klikova *et al.*, 1995). Daher sollte auch die Assemblierungseffizienz der CA und CA-NC Strukturproteine aus HIV-1 und HIV-2 in diesem biologischen „*in vivo*“ System verglichen werden.

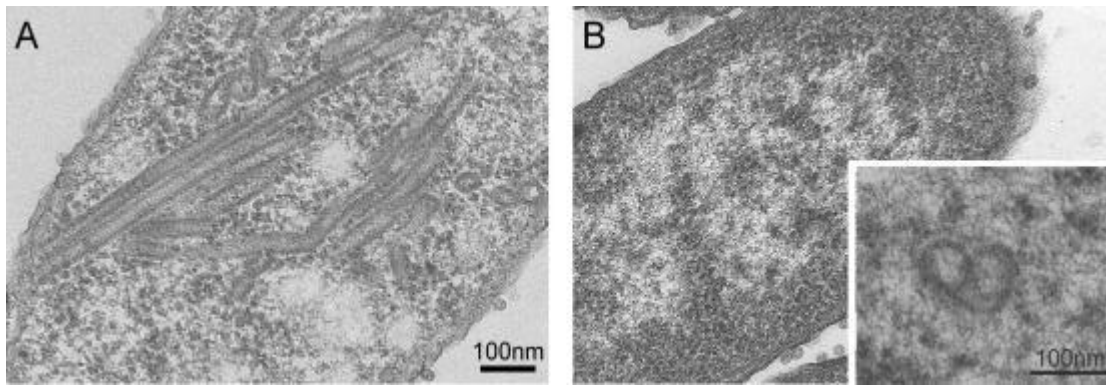


Abb. III.1: Assemblierungseigenschaften von HIV-1 CA-NC-SP2 (A), oder HIV-2 CA-NC (B) innerhalb von Bakterien. *E.coli* BL21 DE3 Zellen, welche die Expressionsvektoren für die entsprechenden Proteine trugen, wurden für 3 h induziert und im Anschluß durch Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie analysiert. Das kleine Bild (in B) wurde bei höherer Vergrößerung aufgenommen als die beiden großen Bilder (A und B) (siehe Längenmarker).

E.coli-Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert, und nach dreistündiger Induktion für Ultradünnschnitte vorbereitet (siehe II.4.2). Fixierung, Färbung, Dehydrierung und Einbettung wurde in Cellulose-Kapillar-Röhrchen vorgenommen. Die gegengefärbten Ultradünnschnitte wurden elektronenmikroskopisch analysiert. CA und CA-NC-SP2 aus HIV-1 bildeten, wie bereits beschrieben (Gross, 1998; Gross *et al.*, 1998), auch innerhalb von *E.coli* Zylinder aus, deren Morphologie identisch zu den entsprechenden *in vitro* assemblierten Partikeln war (Abb. III.1 ,A). Im Fall von HIV-2 CA konnten keine geordneten Strukturen gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso waren meist in Präparationen von HIV-2 CA-NC exprimierenden *E.coli* Zellen lediglich Anhäufungen von amorphen Proteinaggregaten vorhanden. Nur sehr selten sah man fädige, spiralförmige Strukturen, bei denen es sich vermutlich um zweidimensionale Aggregate handelt, nie jedoch reguläre Zylinder (Abb. III.1, B). Auch innerhalb der Bakterienzelle waren weder CA, noch CA-NC aus HIV-2 also nicht in der Lage, geordnete Strukturen zu bilden.

III.3 *In vitro* Eigenschaften des DMA-CA-NC-SP2 Proteins

CA und das C-terminal verlängerte Protein CA-NC-SP2 aus HIV-1 lagern sich *in vitro* zu tubulären Strukturen zusammen (Campbell & Vogt, 1995; Gross *et al.*, 1997). Diese sind wahrscheinlich in ihrem Aufbau mit reifen HIV Kapsiden zu vergleichen, welche eine konusförmige Morphologie aufweisen (Accola *et al.*, 2000; Fuller *et al.*, 1997; Gelderblom *et al.*, 1987; Welker *et al.*, 2000). Verlängert man CA an seinem N-terminalen Ende um Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung, entstehen sphärische Partikel variablen Durchmessers (Gross *et al.*, 1998). Diese entsprechen in ihrer Anordnung eher dem Phänotyp unreifer Virionen. Die einheitlichste Population an Sphären lieferte das Protein Δ MA-CA. Es

enthält eine Deletion der Aminosäuren 16 bis 99 in MA, wodurch der globuläre Teil dieser Domäne entfernt ist. Im Kontext eines infektiösen proviralen Klons verändert diese Deletion nur den Ort der Virusknospung, nicht aber die Morphologie der entstehenden Virionen (Fäcke *et al.*, 1993). Andere Gruppen konnten inzwischen zeigen, daß die gesamte Matrixdomäne für das Virus entbehrlich ist (Reil *et al.*, 1998). Durch Kombination N- und C-terminaler Verlängerung entsteht das Protein Δ MA-CA-NC-SP2, welches sich vom Gag-Polypolypeptid nur durch das Fehlen der Aminosäuren 16-99 aus MA und der C-terminalen p6-Domäne unterscheidet. Dieses Protein assembliert in Abhängigkeit von Nukleinsäuren unter physiologischen Bedingungen zu sphärischen Partikeln. Diese zeichnen sich im Besonderen durch ihre große Regelmäßigkeit und homogene Größenverteilung aus (Abb. III.1). Ihr äußerer Durchmesser von 114 \pm 6 nm, ist mit dem unreifer Virionen (134 \pm 15 nm) vergleichbar, da der Unterschied von ca. 20 nm - im Fall der *in vitro* produzierten Partikel - dem Fehlen der Membran und MA Schichten zuzuschreiben sein dürfte. Auch Analysen der inneren Organisation mit Hilfe der Cryo-Elektronenmikroskopie haben gezeigt, daß sie von unreifen Virionen nicht unterscheidbar sind (Gross *et al.*, 2000).

Wird hingegen das schlechter lösliche Gag Protein voller Länge in die *in vitro* Multimerisierungsreaktion eingesetzt, verringert sich der Durchmesser der entstehenden sphärischen Partikel auf 25-30 nm (Campbell & Rein, 1999). Da auch die Deletion der p6-Domäne die Größe der Partikel unbeeinflusst ließ, ist die in dem Protein Δ MA-CA-NC-SP2 deletierte Region (nur darin unterschieden sich die Proteine Gag Δ p6 und Δ MA-CA-NC-SP2) *in vivo* vermutlich für eine Interaktion mit größenbestimmenden zellulären Faktoren oder Membranen verantwortlich.

Überraschenderweise assemblierte das Protein Δ MA-CA-NC-SP2, abhängig vom pH-Wert, in Strukturen unterschiedlicher Morphologie. Wurde die Multimerisierungsreaktion nicht in leicht alkalischem Milieu (pH 8), sondern bei pH 6 durchgeführt, bildete auch Δ MA-CA-NC-SP2 Zylinder aus. Bei pH 7 war eine Mischung beider Phänotypen zu beobachten. Die unterschiedlichen Phänotypen nach Multimerisierung *in vitro*, konnten mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper korreliert werden, welche gegen Epitope des CA-Proteins gerichtet waren. Wahrscheinlich nimmt die CA-Domäne, in Abhängigkeit vom pH-Wert, unterschiedliche Konformationen ein, die entweder die Bildung sphärischer, oder tubulärer Strukturen unterstützt. *In vivo* ist jedoch eine pH-induzierte Konformationsänderung von CA als Auslöser für die Bildung reifer Kapside unwahrscheinlich, da HIV-1 Partikel durch Knospung an der Zytoplasmamembran hervorgehen und daher keine Möglichkeit besteht, den pH-Werts zwischen

zellulärem und viralem Lumen stark zu verändern. Vermutlich kann die pH-Wert Verschiebung *in vitro* vergleichbare Effekte auslösen, die *in vivo* durch die proteolytische Spaltung der Gag-Domänen entstehen und in der Umlagerung zu reifen Viren resultieren (Gross *et al.*, 2000).

Mit Hilfe von spektroskopischen Techniken sollten die pH-induzierten Konformationsänderungen von Δ MA-CA-NC-SP2, sowie deren Auswirkungen auf das Multimerisierungsverhalten des Proteins weiter untersucht werden. Ferner sollte getestet werden, ob der zeitliche Verlauf der Strukturbildung mit spektroskopischen Methoden verfolgt werden kann.

III.3.1 Spektroskopische Untersuchungen zur Konformationsstabilität von Δ MA-CA-NC-SP2 über einen weiten pH-Bereich

Um die pH-induzierten konformationellen Änderungen von Δ MA-CA-NC-SP2 auf molekularer Ebene weiterführend zu charakterisieren, mußten zunächst ausreichende Mengen von Δ MA-CA-NC-SP2 in gereinigter Form hergestellt werden. Nach dem Aufschluß von Δ MA-CA-NC-SP2 exprimierenden Bakterien, wurde der Zellextrakt durch eine 25%ige Ammoniumsulfatfällung fraktioniert, der gelöste Niederschlag von Nukleinsäuren befreit, und die verunreinigenden Proteine über einer Kationenaustauschersäule abgetrennt (siehe II.3.3.7) (Gross *et al.*, 1998). Das Produkt einer solchen Reinigung ist in Abb. III.1 zu sehen.

Eine Methode zur Detektion konformationeller Änderungen ist die Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie. Dabei wird die ungleiche Absorption von rechts- und linksdrehendem zirkular polarisiertem Licht optisch aktiver Substanzen ausgenutzt. Die Absorption in der Fern-UV oder Amid-Region (170-250 nm) wird hauptsächlich durch den Beitrag von Peptidbindungen bestimmt. Sekundärstrukturelemente wie α -Helix, β -Sheet oder unstrukturierte Bereiche tragen bei bestimmten Wellenlängen unterschiedlich stark zum CD-Spektrum eines Proteins bei (Greenfield & Fasman, 1969). Um zu prüfen, ob sich die Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente von Δ MA-CA-NC-SP2 auf eine pH-abhängige Weise verändert, wurden Fern-UV-CD-Spektren bei pH6 und pH8 aufgenommen. Auf Grund der Selbstassoziation von Δ MA-CA-NC-SP2 mußten die Messungen in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen durchgeführt werden, was die Messung bei Wellenlängen kleiner als 195 nm unmöglich machte. Die Spektren waren bei beiden pH-Bedingungen sehr ähnlich und zeigten einen charakteristischen Verlauf für ein Protein mit hohem Gehalt an α -helikalen Elementen (Abb. III.1). Die Veränderung des pH-Werts hat also keine großen Strukturumlagerungen zur Folge. Bei pH 8 wurde eine kleine Verschiebung der molaren Restelliptizität zu größeren

Werten beobachtet (Abb. III.1). Vermutlich ist die Verringerung der Helizität des Proteins durch eine leichte Auflockerung oder lokale Entfaltung α -helikaler Bereiche bedingt. Zum Vergleich wurde auch ein Fern-UV-CD-Spektrum von Δ MA-CA-NC-SP2 in GdmCl-denaturiertem Zustand aufgenommen (Abb. III.1). Es zeigt Eigenschaften, die für ein entfaltetes Protein typisch sind.

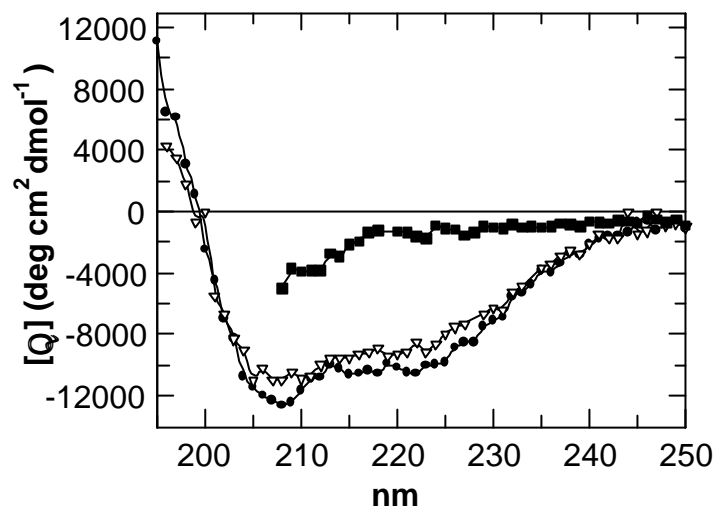


Abb. III.1: Fern-UV-CD-Spektren von Δ MA-CA-NC-SP2 bei pH 6.0 (—), pH 8.0 (---), und pH 6.0 in Gegenwart von 4.3 M Guanidiniumchlorid (GdmCl) (■). Die Spektren wurden bei 21°C und einer Proteinkonzentration von 1.0 mg/ml aufgenommen. Die Proben wurden zuvor für 2 h unter den jeweiligen Bedingungen inkubiert: pH 6 (30 mM MES; 0.5 M NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM DTT) und pH 8 (50 mM Tris; 0.5 M NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM DTT). Die Spektren wurden um den Beitrag des Puffers korrigiert.

Auch mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie ist es möglich, konformationelle Änderungen von Proteinen zu studieren. Sie ist aber im Gegensatz zur CD-Spektroskopie, mit der man in der Fern-UV-Region Beiträge von Sekundärstrukturelementen detektiert, ein empfindliches Maß für Änderungen in der Tertiärstruktur von Proteinen. Die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen wird hauptsächlich durch ihre Tryptophanreste bestimmt (Schmid, 1989). Da deren Fluoreszenzintensität und die Lage ihrer Emissionsmaxima durch den polaren oder unpolaren Charakter des sie umgebenden Milieus bestimmt ist, kann man Aussagen über Veränderungen in der direkten Umgebung der Trp-Reste treffen (Lakowicz, 1983). Die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen verhält sich auf Grund von sekundären Absorptionseffekten bei zu hohen Konzentrationen nur über einen bestimmten Konzentrationsbereich linear. Um den Konzentrationsbereich für Δ MA-CA-NC-SP2 zu bestimmen, in welchem sich Fluoreszenzintensität und Proteinkonzentration proportional zueinander verhalten, wurden Emissionsspektren bei pH 6 und 500 mM NaCl mit steigenden Mengen an Δ MA-CA-NC-SP2 aufgenommen (Abb. III.2, A).

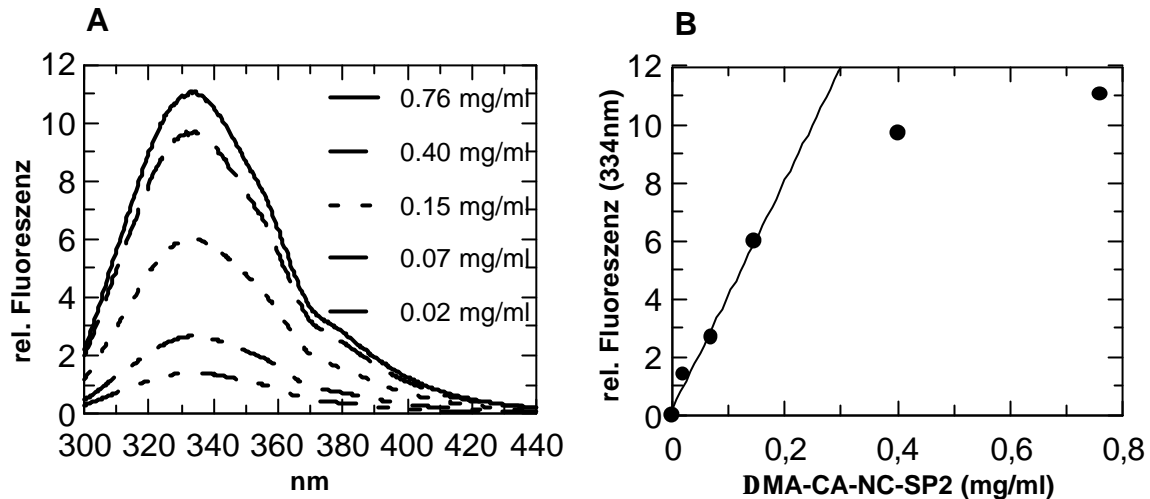


Abb. III.2: Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzemission von Δ MA-CA-NC-SP2. A) Fluoreszenzemissionsspektren von Δ MA-CA-NC-SP2 wurden in 30 mM MES, pH 6.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA und 2 mM DTT bei 21°C und den folgenden Proteinkonzentrationen aufgenommen: 0.02 mg/ml (---), 0.07 mg/ml (- - -), 0.15 mg/ml (· · ·), 0.4 mg/ml (— · —), 0.76 mg/ml (——). Alle Spektren wurden um den Beitrag des Puffers korrigiert. B) Die maximalen Fluoreszenzemissionen (334 nm) der Spektren aus A) wurde gegen die jeweilige Proteinkonzentration aufgetragen (•) und linear gegen Null extrapoliert (—).

Die Spektren wiesen eine für die Proteinemission typische Form auf, mit einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 334 nm (Lakowicz, 1983). Die maximale Fluoreszenzintensität der einzelnen Spektren wurde gegen die jeweilige Proteinkonzentration aufgetragen und der lineare Bereich durch Extrapolation der Datenpunkte gegen Null auf 0 bis 0.15 mg/ml (entspricht 0 bis 3.7 μ M) eingegrenzt (Abb. III.2, B). Daher wurden die pH-induzierten Faltungsübergänge von Δ MA-CA-NC-SP2 bei 0.1 mg/ml Protein gemessen. Δ MA-CA-NC-SP2 wurde bei 21°C in Puffern zwischen pH 2.0 und 9.5 bis zum Erreichen des Gleichgewichts inkubiert. Messungen der Fluoreszenzemission bei 334 nm wurden über einen Zeitraum von 1 Minute gemittelt und gegen den jeweiligen pH-Wert aufgetragen (Abb. III.3). Daraus lassen sich die folgenden Aussagen zur pH-Stabilität von Δ MA-CA-NC-SP2 ableiten: Das Protein liegt bis zu einem pH-Wert von 4.0 in säuredenaturierter Form vor. In dem daran anschließenden pH-Bereich nimmt Δ MA-CA-NC-SP2 seine kompakte, native Konformation ein. Zwischen pH 6.8 und 7.4 ist ein relativ abrupter Signalabfall zu verzeichnen, welcher vermutlich durch ein Aufweichen der Struktur, und damit erhöhter Lösungsmittlexposition des Proteins erklärt werden kann. Dieser Zustand leitet zur alkalisch denaturierten Form über, welche ab pH 8.5 erreicht ist, sich jedoch nur marginal vom vorherigen Zustand unterscheidet (Abb. III.3). Es kann also davon ausgegangen werden, daß die Struktur von Δ MA-CA-NC-SP2 in alkalischem Milieu relativ stabil bleibt. Jedoch unterliegt die Tertiärstruktur von Δ MA-CA-NC-SP2 bei Senkung des pH-Werts von 8 auf 6 relativ großen Änderungen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Daten von Antikörperbindungsstudien

(Gross *et al.*, 2000). Dabei zeigten zwei, gegen CA gerichtete, monoklonale Antikörper, pH-abhängige Unterschiede in ihren Bindungseigenschaften. Beide Antikörper erkannten Δ MA-CA-NC-SP2 bei pH 8, nicht jedoch bei pH 6. Diese pH-Abhängigkeit der Bindung konnte nur durch eine Konformationsänderung des Proteins erklärt werden.

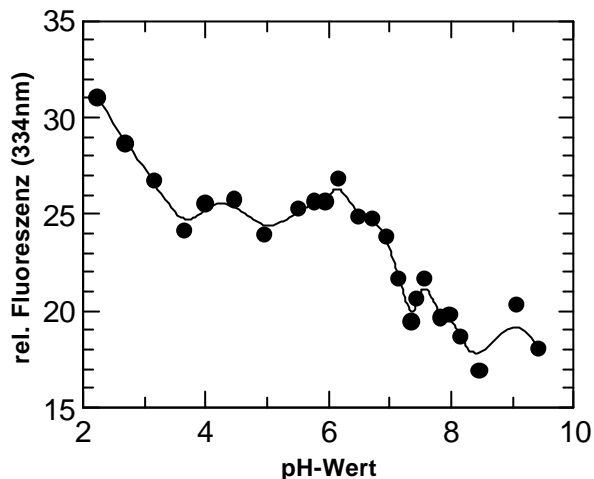


Abb. III.3: Einfluß des pH-Werts auf die maximale Fluoreszenzemission von DMA-CA-NC-SP2. 0.1 mg/ml Δ MA-CA-NC-SP2 wurde bei 21°C für 24 h in verschiedenen Puffern (je 50 mM Puffersubstanz, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT) inkubiert (pH 2.0-3.5: Glycin/HCl; pH 4.0-5.5: Na/Ac; pH 5.8-6.2: MES; pH 6.5-9.5: Tris-HCl). Die Fluoreszenzemission einminütiger Messungen bei 334 nm der einzelnen Proben wurden gemittelt (•). Alle Messungen wurden um den Beitrag des jeweiligen Puffers korrigiert. Die durchgezogene Linie stellt keine Anpassung dar, sondern dient nur zur Orientierung.

III.3.2 Einfluß der Strukturbildung auf die intrinsische Fluoreszenz von DMA-CA-NC-SP2

Das Fluoreszenzsignal von Proteinen ist nicht nur empfindlich gegenüber Tertiärstrukturveränderungen, sondern kann auch durch Protein-Ligand-, oder Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflusst werden (Lakowicz, 1983). So kann z.B. die Selbstassoziation von Proteinen zur spektralen Verschiebung ihrer Emission führen (Talbot *et al.*, 1979). Daher sollte geprüft werden, ob die Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2 mit einer Veränderung von dessen intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften einher geht. Bisher wurde jedoch die Bildung von sphärischen Δ MA-CA-NC-SP2-Partikeln *in vitro* bei Proteinkonzentrationen (1.9 mg/ml) durchgeführt (Gross *et al.*, 2000), die jenseits des linearen Bereichs der Fluoreszenzintensität liegen (0 bis 0.15 mg/ml) (siehe III.3.1 und darin Abb. III.2). Daher mußte der Konzentrationsbereich, der die *in vitro* Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2 erlaubt, in elektronenmikroskopischen Untersuchungen determiniert werden. Die Partikelbildung konnte bis zu 0.1 mg/ml (entspricht 2.47 μ M) Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Emissionspektren von 0.1 mg/ml gelöstem, beziehungsweise assembliertem Δ MA-CA-NC-SP2 zeigten in der Tat einen unterschiedlichen Verlauf (Abb. III.1).

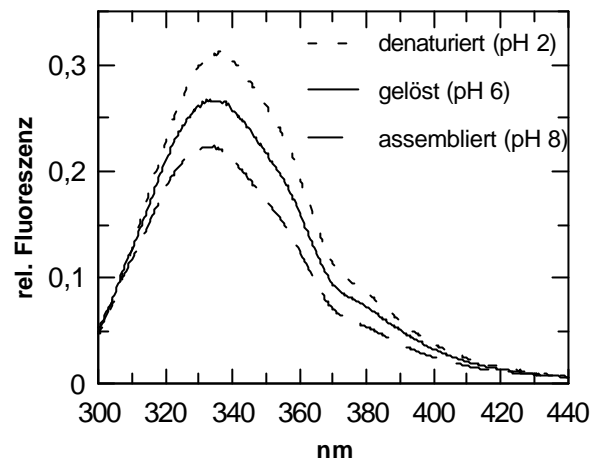


Abb. III.1: Einfluß des Oligomerisierungsgrades von Δ MA-CA-NC-SP2 auf dessen Fluoreszenzemission. Fluoreszenzemissionsspektren von Δ MA-CA-NC-SP2 wurden bei 0.1 mg/ml und 21°C in den folgenden Puffern aufgenommen: gelöstes Protein (—) in Lagerpuffer (30 mM MES, pH 6.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT); säuredenaturiertes Protein (- - -) in (50 mM Glycin/HCl, pH 2.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT); assembliertes Protein (— — —) wurde zuvor zur Multimerisierung gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM DTT und 0.1 M NaCl in Gegenwart von 5% (w/w) eines 73-Basen langen DNA-Oligonukleotids dialysiert. Die Proben wurden mindestens 1 h unter den jeweiligen Bedingungen inkubiert. Alle Spektren wurden um den Beitrag des Puffers korrigiert.

Allerdings änderten sich nach der *in vitro* Zusammenlagerung von Δ MA-CA-NC-SP2 zu Oligomeren nur die relativen Intensitäten des Signals, nicht jedoch die Lage der jeweiligen spektralen Maxima. Der Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen assembliertem (pH 8) und gelöstem (pH 6) Protein korrespondiert mit den für das gelöste Protein bestimmten pH-induzierten Schwankungen. So war auch die Fluoreszenzintensität des in pH 8-Puffer gelösten Δ MA-CA-NC-SP2 kleiner als die des Proteins unter pH 6 Bedingungen (siehe Abb. III.3). Das Ausmaß der beobachteten Intensitätsunterschiede bei pH 6 und pH 8 waren, unabhängig vom Oligomerisierungsgrad des Proteins, miteinander vergleichbar. Zum direkten Vergleich wurde in Abb. III.1 auch ein Emissionsspektrum des säuredenaturierten Δ MA-CA-NC-SP2 dargestellt. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität nach *in vitro* Assemblierung von Δ MA-CA-NC-SP2 reflektiert also nicht den Oligomerisierungsgrad des Proteins. Auf Grund der pH-Sensibilität des Fluoreszenzsignals von Δ MA-CA-NC-SP2 ist dessen Eigenfluoreszenz nicht ausreichend, um zwischen den Multimerisierungszuständen zu differenzieren.

III.3.3 Etablierung eines *in vitro* Verdünnungs-Systems für die Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2

Die Eigenfluoreszenz von Δ MA-CA-NC-SP2 reagiert sehr stark auf Veränderungen des pH-Werts. Vergleicht man Fluoreszenzspektren von gelöstem (pH 6) mit assembliertem (pH 8) Δ MA-CA-NC-SP2, werden mögliche subtile spektrale

Verschiebungen, die für die Selbstassoziation von Δ MA-CA-NC-SP2 spezifisch sind, von den pH-induzierten Effekten überdeckt (siehe III.3.2). Bisher wurde die *in vitro* Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2 zu sphärischen Partikeln durch Dialyse eingeleitet (Gross *et al.*, 2000). Dazu wurden 2 mg/ml des bei 500 mM NaCl in pH 6-Puffer gelösten Proteins nach Hinzufügen von 5% (w/w) einzelsträngigen Oligonukleotiden gegen pH 8-Puffer dialysiert. Dieser enthielt nur 100 mM NaCl, um eine Interaktion zwischen Protein und Nukleinsäure zu erlauben (siehe II.3.4.1.2). Die entstehenden Partikel konnten elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Abb. III.1).

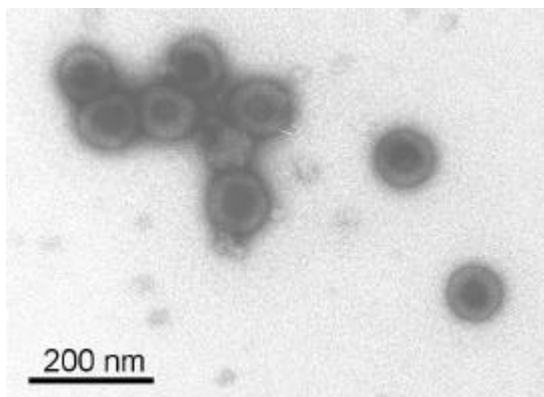


Abb. III.1: Produkte der *in vitro* Assemblierung von HIV-1 Δ MA-CA-NC-SP2. 2 mg/ml Δ MA-CA-NC-SP2 wurden für 2 h in Gegenwart von 5% (w/w) eines 73-Basen langen DNA-Oligonukleotids gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM DTT und 0.1 M NaCl dialysiert und der Reaktionsansatz 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Viertel des Ausgangsvolumens in Dialysepuffer aufgenommen und nach Negativfärbung mit 2% Uranylacetat elektronenmikroskopisch analysiert.

Bei diesem Vorgehen wurde also der pH-Wert, welcher einen großen Einfluß auf die Morphologie der gebildeten Partikel ausübt, stark variiert. Es wäre daher von Vorteil, Bedingungen definieren zu können, unter denen der Prozeß der Dialyse umgangen werden kann und die Multimerisierungsreaktion allein durch Verdünnung des Proteins in den entsprechenden Puffer, oder durch Zugabe von Nukleinsäuren gestartet werden kann. Neben der Konstanzhaltung des pH-Werts würde diese Methode ferner die zeitliche Verfolgung des Reaktionsverlaufs ermöglichen. Aus elektronenmikroskopischen Analysen konnte geschlossen werden, daß sich bereits nach 15 minütiger Dialyse die ersten vollständigen Assemblierungsprodukte gebildet haben (Gross, 1998). Nach diesem Zeitraum müßten innerhalb des Dialyseschlauchs ein pH-Wert von ca. 6.8 und eine Salzkonzentration von ungefähr 175 mM vorliegen (Gross, 1998). Versuche, das Protein durch Vordialyse auf diese Bedingungen einzustellen und die Multimerisierung im Anschluß daran durch Zugabe von Nukleinsäuren zu starten, führten jedoch nur zur Bildung unstrukturierter Proteinaggregate (Gross, 1998). Ausgehend davon sollten nun elektronenmikroskopisch kontrolliert Bedingungen für die Verdünnung von hochkonzentrierten Lösungen an Δ MA-CA-NC-SP2 in nukleinsäurehaltige Puffer gefunden werden, unter denen die Multimerisierung möglich ist. Es wurden 5% (w/w) eines einzelsträngigen Oligodesoxynukleotids (73mer) bei 4°C und pH 6.0, 6.5, 7.0,

7.2, 7.4, 7.6 oder 8.0 und NaCl-Konzentrationen zwischen 130 mM und 360 mM vorgelegt, Δ MA-CA-NC-SP2 in diesen Ansatz zu einer Endkonzentration von 2.0 mg/ml verdünnt, und die Assemblierungsprodukte nach Zentrifugation analysiert (siehe II.3.4.2). Diese wurden mit den Dialyse-induzierten sphärischen Partikeln direkt verglichen (Abb. III.1). Insgesamt fanden sich in allen Ansätzen Strukturen ähnlicher Morphologie, die Effizienz der Strukturbildung variierte jedoch sehr stark. Die Partikel waren, verglichen mit Dialyse-induzierten Δ MA-CA-NC-SP2-Sphären, bei weitem nicht so regelmäßig in ihrer äußeren Form. Es bildeten sich neben Sphären auch ovale bis hin zu kurzen zylindrischen Strukturen, die in ihren Dimensionen etwas kleiner als die Dialyse-induzierten Δ MA-CA-NC-SP2-Sphären waren (Abb. III.2).

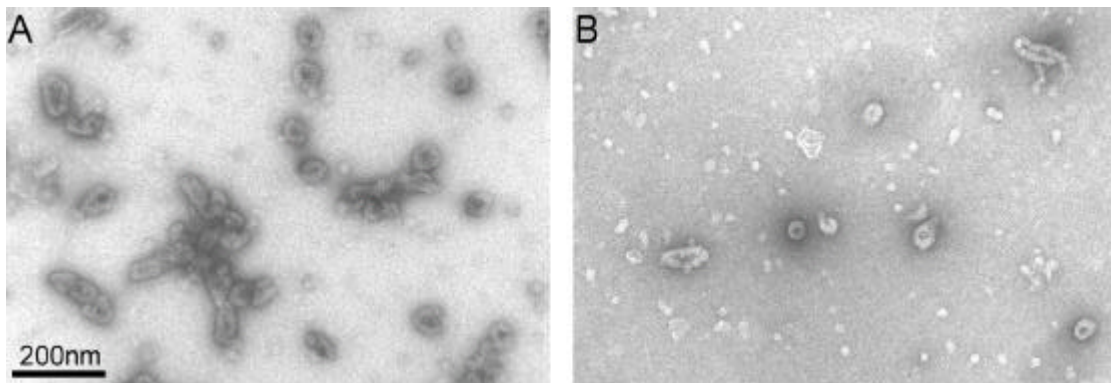


Abb. III.2: In vitro Assemblierung von Δ MA-CA-NC-SP2 induziert durch Verdünnung. Δ MA-CA-NC-SP2 wurde auf eine Endkonzentration von 2.0 mg/ml (A) oder 0.1 mg/ml (B) in 50 mM HEPES, pH 7.0, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT und 5% (w/w) eines 73-Basen langen DNA-Oligonukleotids verdünnt. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C und Negativfärbung mit 2% Uranylacetat wurden die Proben elektronenmikroskopisch analysiert. Beide Bilder haben die gleiche Vergrößerung.

Wie schon für die Dialyse-induzierten Sphären beschrieben (Gross *et al.*, 2000), waren die meisten Strukturen nicht vollständig geschlossen. Des weiteren waren die Partikelpräparationen geringfügig stärker durch unstrukturierte Aggregate verunreinigt. Die unterschiedlichen pH-Werte wirkten sich nicht auf die Morphologie der gebildeten Partikel aus, sondern lediglich auf ihre Menge. Dies steht im Gegensatz zu der durch die Dialyse-induzierten Partikelbildung: Je nach pH-Wert lagerte sich in diesem Fall Δ MA-CA-NC-SP2 zu Zylindern (pH6) oder Sphären (pH 8) zusammen (Gross *et al.*, 2000). Da die Effizienz der Verdünnungs-induzierten Partikelbildung in einem pH-Bereich zwischen 6.0 und 7.6 in etwa gleich gut war, können die pH-Anforderungen nicht besonders stringent sein. Höhere pH-Werte hingegen schienen die Strukturbildung zu unterdrücken. Dieser Befund war überraschend, da pH 8 der in der Dialysen-induzierten Multimerisierung eingesetzte pH-Wert ist. Er unterstützt jedoch die Hypothese, daß nicht die Endbedingungen bei

der Dialyse für die Assemblierung ausschlaggebend sind, sondern die Initialisierung durch die erforderliche Konformationsänderung bereits bei einem pH-Wert von ca. 7 vor sich geht (Gross *et al.*, 2000). Neben dem pH-Wert war auch der Toleranzbereich für die Ionenstärke mit NaCl-Konzentrationen zwischen 150 mM und 220 mM relativ groß. Bei höheren Salzkonzentrationen sank die Effizienz der Partikelbildung abrupt ab, was vermutlich auf eine Unterdrückung der Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung zurückzuführen ist. Geringere Konzentrationen als 150 mM NaCl könnten eine zu schnelle Multimerisierung fördern und somit geordnete Prozesse verhindern. Die Δ MA-CA-NC-SP2-Konzentration konnte bei einem pH-Wert von 7.0 und einem NaCl-Gehalt von 180 mM bis auf 2.47 μ M (entspricht 0.1 mg/ml) verringert werden (Abb. III.2, B). Erst bei niedrigeren Proteinkonzentrationen war keine Partikelbildung mehr möglich. Zum Vergleich der Partikelbildungseffizienz in der Verdünnungsreaktion mit der der Dialyse wurde die folgende Vorgehensweise gewählt: Die beiden Reaktionen wurden bei einer Δ MA-CA-NC-SP2-Konzentration von 1.0 mg/ml in gleichem Volumen gestartet. Für die Dialyse wurden die üblichen Bedingungen gewählt (pH 8, 100 mM NaCl) (siehe II.3.4.1.2), für die Verdünnungsreaktion ein pH-Wert von 7.0 und 180 mM NaCl. Beide Ansätze wurden für 45 min bei 4°C inkubiert. Jeweils das gleiche Volumen wurde zur Selektion nach gebildeten Partikeln bei 14000 rpm für 5 min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und das Pellet im gleichen Volumen gelöst. Es wurde gezeigt, daß sich *in vitro* gebildete Δ MA-CA-NC-SP2-Partikel bei hohen Konzentrationen durch eine fünfminütige Zentrifugation anreichern lassen, da sie miteinander Aggregieren (Gross *et al.*, 2000). Der Überstand wurde für 1 h erneut zentrifugiert, um unstrukturierte Aggregate daraus zu entfernen. Auch dieses Pellet wurde in dem Ausgangsvolumen aufgenommen. Jeweils gleiche Mengen des 5 min- und 1 h-Pellets, sowie des Überstands, der nur noch gelöstes Protein beinhalten sollte, wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Coomassie-gefärbten Banden wurden densitometrisch analysiert (siehe II.3.2.2). Die entsprechenden Mengenverhältnisse sind in der folgenden Tabelle prozentual wiedergegeben:

	Verdünnung	Dialyse
5 min-Pellet:	49%	30%
1 h-Pellet:	4%	13%
Überstand:	47%	57%

Tab. III.1: Vergleich der *in vitro* Multimerisierungseffizienzen von Δ MA-CA-NC-SP2-Verdünnung oder Dialyse bei 1.0 mg/ml Protein. Die prozentualen Anteile der jeweiligen Fraktionen wurden densitometrisch nach 17.5%iger SDS-PAGE bestimmt.

Der Anteil an Δ MA-CA-NC-SP2 im 5 min-Pellet ist in der Verdünnungsreaktion um ca. 2/3 größer als in der Dialyse. Es ist anzunehmen, daß sich in diesem Wert nicht nur die Effizienz der Partikelbildung, sondern auch die etwas erhöhte Tendenz zur Bildung unstrukturierter Aggregate im Fall der Verdünnungsreaktion spiegelt. Man kann also davon ausgehen, daß beide Systeme in etwa gleich effizient sind.

Es sollte nun getestet werden, ob das ebenfalls Nukleinsäure-abhängig assemblierende Protein CA-NC-SP2 von HIV-1 in der Lage ist, sich in der Verdünnungsreaktion zu Partikeln zusammenzulagern (siehe III.2.1). Die Reaktion wurde bei pH 7.0 oder pH 7.6 und einer NaCl-Konzentration von 180 mM durchgeführt. In beiden Ansätzen fanden sich kurze zylindrische Strukturen, die von den in der Dialyse gebildeten längeren Röhren, nur durch ihrer Länge unterscheidbar waren (Abb. III.3). Vereinzelt wurden auch konusförmige Strukturen beobachtet, die den während der Dialyse gebildeten vergleichbar waren (siehe III.2.1).

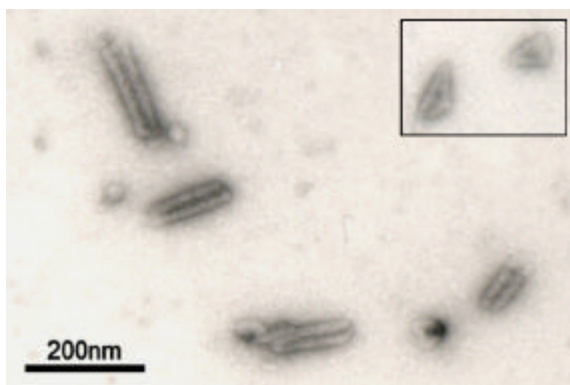


Abb. III.3: In vitro Assemblierung von HIV-1 CA-NC-SP2 induziert durch Verdünnung. HIV-1 CA-NC-SP2 wurde auf eine Endkonzentration von 0.15 mg/ml in 50 mM HEPES, pH 7.6, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT und 5% (w/w) eines 73-Basen langen DNA-Oligonukleotids verdünnt. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C und Negativfärbung mit 2% Uranylacetat wurden die Proben elektronenmikroskopisch analysiert. Das kleine Bild zeigt einen anderen Ausschnitt des Originalbildes bei gleicher Vergrößerung. Zu erkennen sind konusartige Strukturen.

Die Verdünnung stellt also neben der Dialyse eine effiziente Methode für die *in vitro* Multimerisierung NC-haltiger Proteine in Gegenwart von Nukleinsäuren dar. Es kann davon ausgegangen werden, daß die *in vitro* gebildeten Δ MA-CA-NC-SP2- oder CA-NC-SP2-Partikel, unabhängig von der für ihre Bildung gewählten Methode (Dialyse oder Verdünnung), durch vergleichbare Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert werden.

III.3.4 Zeitlicher Verlauf der Δ MA-CA-NC-SP2 Assemblierung

Mit Hilfe der etablierten Verdünnungs-induzierten Multimerisierungsreaktion (siehe III.3.3), sollte geprüft werden, ob in diesem pH-stabilen System der Verlauf der Selbstassoziation von Δ MA-CA-NC-SP2 verfolgt werden kann.

Als Verdünnungspuffer wurde 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.04% PEG 20000, 2mM DTT, 180 mM NaCl und 5% (w/w) eines Oligodesoxynukleotids (73mer) gewählt, welcher bei 20°C vorinkubiert wurde. Die Anwesenheit von PEG 20000 soll das Benetzen der Küvettenwand mit Protein verhindern (Vuilleumier *et al.*, 1997). Da das

Konzentrationslimit von Δ MA-CA-NC-SP2 für ein stabiles Fluoreszenzsignal 0.15 mg/ml (siehe III.3.1) und das für die Multimerisierung 0.1 mg/ml (siehe III.3.3) betrug, wurde die Reaktion mit der Verdünnung von Δ MA-CA-NC-SP2 auf eine Endkonzentration von 0.1 mg/ml Protein gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde durch die Aufnahme von Emissionsspektren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Reaktionsstart (siehe II.5.2.1) bei 20°C verfolgt (Abb. III.1, A).

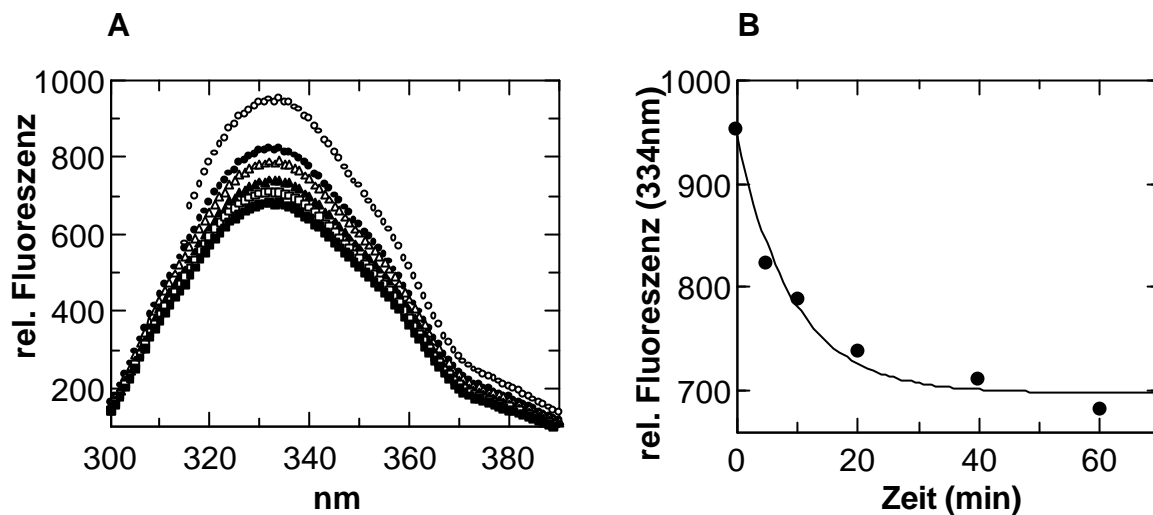


Abb. III.1: Zeitliche Veränderung der DMA-CA-NC-SP2-Emission nach Initiation der Multimerisierungsreaktion durch Verdünnung. A) HIV-1 CA-NC-SP2 wurde auf eine Endkonzentration von 0.1 mg/ml in 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.04% PEG 20000, 2 mM DTT, 180 mM NaCl und 5% (w/w) eines Oligodesoxynukleotids (73mer) verdünnt. Es wurden zu den folgenden Zeitpunkten Proteinemissionsspektren aufgenommen: 0 min (○), 5 min (●), 10 min (△), 20 min (▲), 40 min (□) und 60 min (<). B) Die maximalen Fluoreszenzemissionen (334 nm) der Spektren aus A) wurden gegen die Zeit aufgetragen (●) und mit einer einfachen Exponentialfunktion angepaßt (—).

Während der Wartezeiten wurde die Probe nicht angeregt, um ihr Ausbleichen (Photobleach) zu verhindern. Auch bei diesem Versuchsaufbau wurde lediglich eine Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit beobachtet, aber keine Wellenlängenverschiebung des Maximums (siehe auch III.3.2). Trägt man die Intensität der Fluoreszenzmaxima der Emissionsspektren gegen die Zeit auf, wird deutlich, daß sich das Signal einer einfachen Exponentialfunktion folgend verändert (Abb. III.1, B). Eine dementsprechende Anpassung der Daten ergibt eine Rate k für die Verringerung der Fluoreszenzintensität von 0.11 min^{-1} . Dies entspricht einer Zeitkonstanten τ , von 9.1 min oder einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 6.3 min (siehe II.5.2.1). Diese Werte stehen in Einklang mit dem elektronenmikroskopisch bestimmten Zeitrahmen für die Multimerisierung von ca. 15 min (Gross, 1998). Die exponentielle Abnahme der Fluoreszenzintensität spricht des weiteren für die Spezifität des Signals als Maß für die Multimerisierung, da eine durch Ausbleichen der Probe induzierte Intensitätsabnahme über einen größeren Zeitraum linear verlaufen würde. Mit diesem Versuch alleine ist jedoch nicht auszuschließen, daß anstelle der Kinetik

der Selbstassoziation von Δ MA-CA-NC-SP2, nur die der pH-induzierten Konformationsänderung oder aber eine Überlagerung beider Prozesse verfolgt wurde. Auch hier wurde das Protein von pH 6.0-Bedingungen (Lagerung) auf pH 7.5 (Multimerisierungsreaktion) verdünnt, mußte sich also den neuen pH-Bedingungen anpassen. Es ist jedoch nicht bekannt, wie schnell das pH-Konformationsgleichgewicht von Δ MA-CA-NC-SP2 bei der gewählten Temperatur erreicht wird.

III.3.5 Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad von Δ MA-CA-NC-SP2 mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Methode zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius von in Lösung befindlichen Makromolekülen (ProteinSolutions, 1998). Da die Bildung sphärischer Δ MA-CA-NC-SP2-Partikel mit einer vielfachen Vergrößerung des Radius einher geht und die entstehenden Sphären in ihren Durchmessern sehr homogen sind, sollte sich die DLS dazu eignen, den Oligomerisierungsgrad des Proteins zu analysieren. Voraussetzung für diese Methode ist jedoch, daß die gelösten Partikel in maximal drei Populationen unterschiedlicher Größe vorliegen. Das detektierte Signal setzt sich aus einer Überlagerung der Beiträge aller Populationen zusammen, zwischen denen erst durch die Anwendung mathematische Algorithmen differenziert werden kann (siehe II.5.5).

Um zunächst den Zustand des im Lagerpuffer gelösten Proteins zu charakterisieren, wurden Messungen von Δ MA-CA-NC-SP2 bei steigenden Proteinkonzentrationen durchgeführt. Zur Gewährleistung eines Signal zu Rausch-Verhältnisses größer gleich 2, mußten mindestens 0.26 mg/ml Protein eingesetzt werden. Exemplarisch ist eine Messung bei 1.05 mg/ml Δ MA-CA-NC-SP2 dargestellt (Abb. III.1). In der Regel setzt sich eine Meßreihe aus 20 Einzelmessungen zusammen. Für eine Messung wird der zeitliche Veränderung des Streusignals aufgenommen und hiervon die Autokorrelationsfunktion (AKF) gebildet (siehe II.5.5).

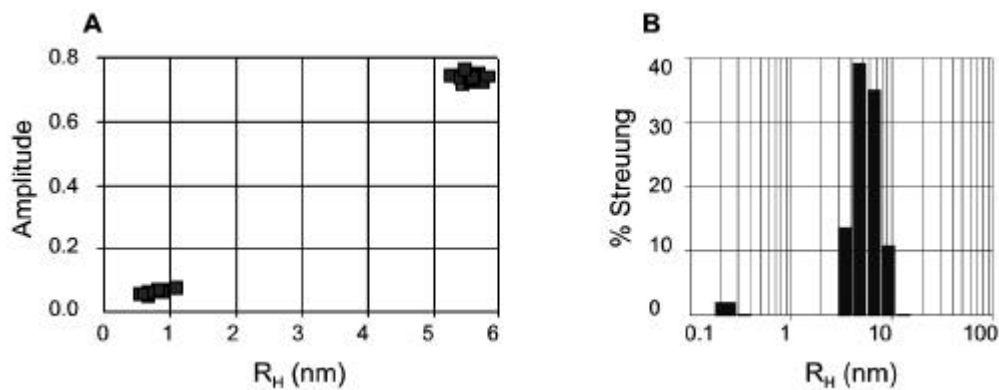


Abb. III.1: Dynamische Lichtstreuung von 1.05 mg/ml DMA-CA-NC-SP2 in (30 mM MES, pH 6.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT. A) Auswertung unter der Voraussetzung eines bimodalen Systems. Jede Einzelmessung aus einer Meßreihe liefert die Radien zweier Populationen. Die beiden Populationen aller Messungen haben hydrodynamische Radien R_H von < 1 nm und 5.8 nm. B) Auswertung nach dem Prinzip der Regularisierung. Es ergeben sich zwei Größenverteilungen.

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius wurde eine Anpassung entsprechend eines bimodalen Systems vorgenommen. Das Streudiagramm zeigt die Aufteilung in zwei Populationen (Abb. III.1, A). Partikel mit einem hydrodynamischen Radius kleiner oder gleich 1 nm stellen Pufferbeiträge dar und können demnach vernachlässigt werden. Unter Anwendung des Regularisierungsprotokolls ergibt sich eine Größenverteilung deren Breite und Position mit den Werten der bimodalen Anpassungen übereinstimmt (Abb. III.1, B). In der folgenden Tabelle sind die durch das Regularisierungsverfahren bestimmten Werte der einzelnen Δ MA-CA-NC-SP2 Messungen zusammengefaßt:

Proteinkonzentration (mg/ml)	R_H (nm)	MW (kD)
0.26	4.8	ca. 130
0.50	4.8	ca. 130
1.05	5.8	ca. 207
1.50	5.8 und 53.6	ca. 207 und 45294

Tab. III.1: Einfluß der Proteinkonzentration auf den hydrodynamischen Radius der entstehenden Δ MA-CA-NC-SP2-Oligomere, gemessen mit Hilfe der DLS.

Selbst bei den niedrigsten noch meßbaren Proteinkonzentrationen dominierten Partikel mit einem hydrodynamischen Radius von 4.8 nm, entsprechend eines Molekulargewichts von ca. 130 kD. Da Δ MA-CA-NC-SP2 ein aus dessen Aminosäurezusammensetzung berechnetes Molekulargewicht von 40.4 kD besitzt, kann die 4.8 nm Spezies kein Monomer, aber möglicherweise ein Trimer darstellen. Bei steigender Proteinkonzentration ändert sich der Radius auf ca. 6 nm, entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 207 kD, bis schließlich auch hochmolekulare Aggregate auftreten (45294 kD) (Tab. III.1).

Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, daß durch die für die DLS erforderliche Probenpräparation - das Filtrieren durch Filter mit einer Porengröße von 0.1 μm - noch größere Aggregate bereits entfernt wurden. Je mehr Protein eingesetzt wurde, um so mehr stieg der Oligomerisierungsgrad, aber auch die Polydispersität der Lösung. Auf Grund der wesentlich höheren Streuintensität großer Moleküle besteht ferner die Gefahr, daß die Streubeiträge kleiner Moleküle (Monomer) überdeckt werden. Messungen von Proben, die durch höhermolekulare Aggregate verunreinigt sind, werden von ihnen dominiert und dadurch erheblich gestört. Daher wurde versucht, die Oligomere durch Zugabe von 5% Acetonitril aufzulösen. Diese Konzentration an Acetonitril ist in der Regel ausreichend, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu unterdrücken. Allerdings hatte auch bei diesen Messungen die kleinste detektierbare Population einen hydrodynamischen Radius von 4.8 nm (Daten nicht gezeigt). Insgesamt nehmen die Radien der dominierenden Spezies mit steigender Proteinkonzentration zu. Daher wurden die Daten der Messungen ohne Acetonitril mit Hilfe der statischen Lichtstreuung interpretiert (ProteinSolutions, 1998). Dabei wird das Molekulargewicht bestimmt, indem die bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen determinierten Radien (Tab. III.1) auf eine Konzentration von Null mg/ml linear extrapoliert werden. In guter Übereinstimmung mit dem berechneten Molekulargewicht, ergab diese Methode einen Wert von 38.9 kD für sehr geringe Proteinkonzentrationen. Die Größe der in Lösung befindlichen $\Delta\text{MA-CA-NC-SP2}$ -Spezies zeigt also eine direkte Abhängigkeit zur Proteinkonzentration. Das läßt darauf schließen, daß $\Delta\text{MA-CA-NC-SP2}$ erst bei wesentlich geringeren, als den für die Messung nötigen Proteinkonzentrationen als Monomer vorliegt. Es konnte also keine konzentrationsunabhängige Größenverteilung für gelöstes $\Delta\text{MA-CA-NC-SP2}$ definiert werden. Als Kontrolle und zur Validierung der DLS wurden Messungen an dem gut löslichen Protein CypA bei 0.9 mg/ml Protein durchgeführt. Diese ergaben in guter Übereinstimmung mit dem berechneten Molekulargewicht von 18.0 kD einen Wert von 17.9 kD (Daten nicht gezeigt).

Der Versuch, die Größe sphärischer $\Delta\text{MA-CA-NC-SP2}$ -Partikel und die Verteilung der $\Delta\text{MA-CA-NC-SP2}$ -Moleküle zwischen unassemblierten und assemblierten Populationen, also die Effizienz der Partikelbildung, mit Hilfe der DLS zu bestimmen, gestaltete sich als unmöglich. Die Streuintensität der Proben war zu gering, da der größte Teil an gebildeten Sphären bei der Filtration der Probe verloren ging. Aus elektronenmikroskopischen Analysen und Zentrifugationsexperimenten ist bekannt, daß bei den gewählten Proteinkonzentrationen von 2.0 mg/ml auch diese Partikel zur Aggregation neigen.

III.4 Analyse der Protein-Nukleinsäure Interaktion Gag-abgeleiteter Proteine

HIV-1 wird zunächst in der infizierten Zelle als unreifes Virion gebildet. Es besteht hauptsächlich aus dem Gag-Polyprotein, einem Fusionsprotein der strukturbildenden Proteine MA, CA und NC. Die proteolytische Prozessierung von Gag führt zur konformationellen und örtlichen Umlagerung der Strukturproteine, der Virusreifung. Dabei ist NC als Teil des Gag-Polyproteins für die spezifische Erkennung und Verpackung des viralen RNA-Genoms zuständig. Dies geschieht über eine direkte Wechselwirkung der NC-Domäne mit dem RNA-Verpackungssignal. Nach Abspaltung vom Gag-Polyprotein ist NC in seiner vollständig prozessierten Form für die sequenzunabhängige Komplexierung des gesamten RNA-Genoms und somit der Kondensation in den schützenden Nukleokapsidkomplex verantwortlich. Dabei umgibt NC das gesamte Genom auf eine Histon-ähnliche Weise (Chen *et al.*, 1980; Fleissner & Tress, 1973; Meric *et al.*, 1984; Stewart *et al.*, 1990). Während der Virusbildung werden unspezifische RNA-Moleküle sehr ineffizient verpackt, wohingegen nach der Reifung unspezifische Interaktionen zu überwiegen scheinen. Es sollten im Folgenden die Nukleinsäurebindungseigenschaften der verschiedenen Gag Spaltprodukte auf dem Weg von Gag zum vollständig prozessierten NC, also von unreifer zu reifer Form, mittels biophysikalischer Methoden untersucht werden.

III.4.1 Expression und Reinigung von CA146NC, NC und NC-SP2

Um die im Verlauf der Virusreifung scheinbar unterschiedlichen Anforderungen an die NC-Domäne näher zu untersuchen, wurden vier Expressionskonstrukte für Gag-abgeleitete Proteine unterschiedlicher Länge kloniert, welche alle die nukleinsäurebindende Domäne NC enthalten. Sie sind schematisch und im Vergleich zu Gag voller Länge in Abb. III.1, A dargestellt. Keines der Konstrukte enthält die p6-Domäne, da ihre An- oder Abwesenheit die *in vitro* Assemblierung von CA-NC-Proteinen nicht beeinflusst (Campbell & Vogt, 1995). Das längste verwendete Konstrukt kodiert für das Protein Δ MA-CA-NC-SP2, welches eine Deletion der Aminosäuren 16 bis 99 aus Matrix aufweist. Eine Deletion dieses Bereiches beeinflusst weder *in vivo*, noch *in vitro*, die Morphologie der entstehenden Partikel (Fäcke *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 2000). Daher sollte die Art der Nukleinsäureinteraktion von Δ MA-CA-NC-SP2 mit der des Gag Proteins vergleichbar sein. Es hat jedoch gegenüber dem Gag Protein voller Länge den für *in vitro* Studien entscheidenden Vorteil besserer Löslichkeit (Gross, I. persönliche Mitteilung). Das zweitlängste Konstrukt kodiert für das während der Gag Prozessierung potentiell vorkommende CA-NC-SP2. CA146NC hingegen ist eine verkürzte Version von CA-NC-SP2. Beginnend mit der Aminosäure Ser146 von CA, fehlt ihm die N-terminale

Faltungsdomäne von CA und des weiteren das C-terminale Spacerpeptid SP2. Das kürzeste Konstrukt birgt die Sequenz für das ebenfalls natürlich vorkommende Protein NC-SP2. Die entsprechenden Gene wurden in *E.coli* exprimiert und die Proteine im Anschluß daran gereinigt.

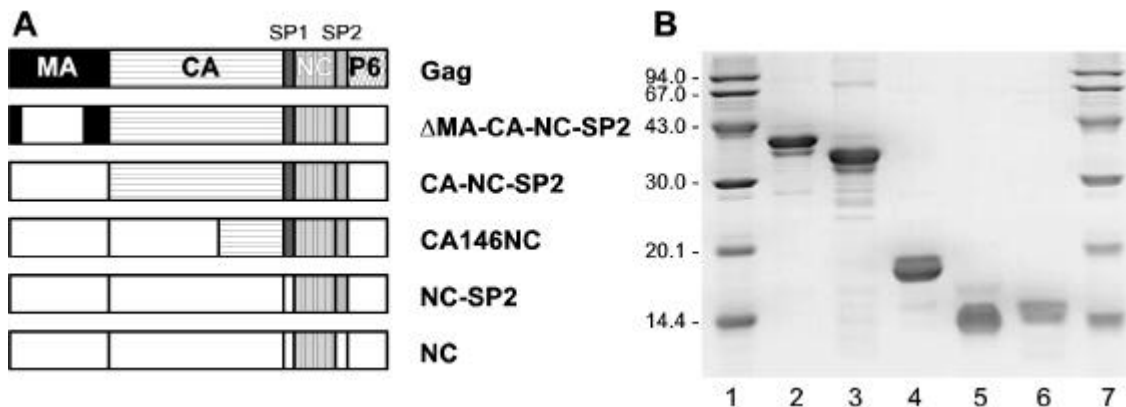


Abb. III.1: Gereinigte Gag-abgeleitete Proteine. A) Schematische Darstellung der Expressionsprodukte verglichen mit dem HIV-1 Gag Protein voller Länge (ganz oben). MA ist in schwarz, CA quergestreift, SP1 dunkelgrau, NC längsgestreift, SP2 hellgrau, und P6 schraffiert dargestellt. Die Größe der einzelnen Abschnitte repräsentiert die tatsächliche Länge der Proteindomänen. **B)** Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (17.5%; 30:0.8) der gereinigten Proteine. In Spur 2 ist Δ MA-CA-NC-SP2 (5.5 μ g); in Spur 3, CA-NC-SP2 (5.4 μ g); in Spur 4, CA146NC (7.2 μ g); in Spur 5, NC (4.4 μ g) und in Spur 6, NC-SP2 (2.4 μ g) aufgetragen. Molekulargewichtsmarker sind in Spuren 1 und 7 aufgetragen und auf der linken Seite gekennzeichnet (in kD).

Die Reinigungsverfahren für die Proteine Δ MA-CA-NC-SP2 und CA-NC-SP2 wurden bereits beschrieben (siehe III.3.1 und III.2.1). Die Produkte sind in Abb. III.1, B dargestellt. Die Proteine CA146NC und NC-SP2 wurden auf sehr ähnliche Weise aus dem *E.coli* Gesamtextrakt gereinigt. Die Lyse der Bakterienzellen war gefolgt von einer Ammoniumsulfatfällung. Der gelöste Niederschlag wurde von Nukleinsäuren befreit und im Fall von NC-SP2 einer Phosphozellulosebehandlung unterzogen. Als letzter Schritt wurde mit beiden Proteinlösungen eine Heparin-Chromatographie durchgeführt. Der Verlauf einer NC-SP2 Reinigung ist in Abb. III.2, der einer CA146NC Reinigung in Abb. III.3, A, die Endprodukte beider Reinigungen in Abb. III.1 gezeigt. Aufgrund großer Verluste an den Chromatographiematerialien waren die Ausbeuten der NC-SP2-Reinigungen in der Regel sehr gering. Daher wurde dazu übergegangen, vollständig prozessiertes NC durch die proteolytische Spaltung von CA146NC herzustellen. CA146NC wurde bei Raumtemperatur für 1 h mit gereinigter HIV-1 Protease (zur Verfügung gestellt von U. Tessmer) inkubiert und die abgespaltene NC-Domäne über einer HE-Säule von dem C-terminalen Teil von CA getrennt (siehe II.3.3.8) (Abb. III.3, B). Die während des Proteaseverdaus entstandenen Spaltprodukte konnten durch das Western-Blot-Verfahren unter der Verwendung spezifischer Antikörper (gerichtet gegen CA: α -HIV-1 CA, oder NC: α -HIV-1 NC; siehe II.3.1.2) identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

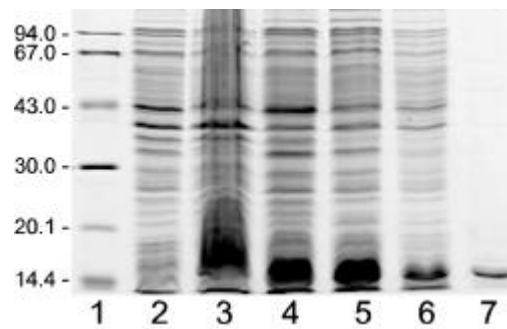


Abb. III.2: Reinigung von NC-SP2. Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (17.5%; 200:1) eines Reinigungsverlaufs von NC-SP2. Spuren: 2 und 3, Zellysate uninduzierter und induzierter Bakterien; 4, Überstand der Zentrifugation bei 14000 rpm; 5, gelöstes Pellet der 45% Ammoniumsulfatfällung; 6, Durchfluß der HQ-Chromatographie; 7, gelöstes Pellet der, einer HE-Chromatographie nachfolgenden 60% Ammoniumsulfatfällung. Molekulargewichtsmarker ist in der ersten Spur aufgetragen und auf der linken Seite gekennzeichnet (in kD).

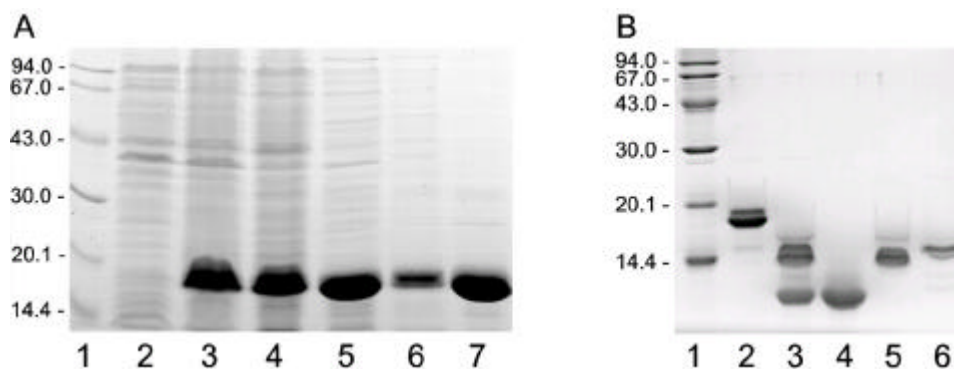


Abb. III.3: Reinigung von CA146NC und NC. A) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (17.5%; 200:1) eines Reinigungsverlaufs von CA146NC. Spuren: 2 und 3, Zellysate uninduzierter und induzierter Bakterien; 4, Überstand der Zentrifugation bei 20000 rpm; 5, gelöstes Pellet der 25% Ammoniumsulfatfällung; 6, Durchfluß der HQ-Chromatographie; 7, gelöstes Pellet der, einer HE-Chromatographie nachfolgenden 50% Ammoniumsulfatfällung. B) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (17.5%; 30:0.8) einer proteolytischen Spaltung von CA146NC: Spur: 2, CA146NC (8 µg), 3, CA146NC (8 µg) nach einstündiger Inkubation mit HIV-1 Protease bei 21°C im molaren Verhältnis von 490:1 (CA146NC/PR); 4, CA146, abgespaltene C-terminale Domäne von CA; 5, durch HE-Chromatographie abgetrenntes NC und 6, NC-SP2 (2.4 µg). Molekulargewichtsmarker sind jeweils in der ersten Spur aufgetragen und auf der linken Seite gekennzeichnet (in kD).

III.4.2 Tryptophanfluoreszenz-Messungen Gag abgeleiteter Proteine

Um einen geordneten Ablauf zu gewährleisten, ist der HIV-Replikationszyklus einer Vielzahl von molekularen Regulationsmechanismen unterworfen. So erfüllt NC als Teil des Gag-Polypeptids und in seiner prozessierten Form eine ganze Reihe von Funktionen, welche bestimmten Phasen des Replikationszyklus zugeordnet werden können. Alle diese Funktionen basieren auf der Interaktion mit Nukleinsäuren. Es galt zu untersuchen, ob die Nukleinsäurebindungseigenschaften von NC mit dem Grad seiner Reifung korrelieren und auf diese Weise ein Zusammenhang zwischen Regulation und Funktion hergestellt werden kann. Daher wurden die

Dissoziationskonstanten (K_d) für die Komplexe aus Nukleinsäuren und einer ganzen Reihe Gag-abgeleiteter Proteine bestimmt, die den Grad der Prozessierung von NC reflektieren. Als Signal für die Komplexbildung wurde die Abnahme der Tryptophanfluoreszenz während der Titration des jeweiligen Proteins mit Nukleinsäuren verfolgt. Diese Methode wurde bereits für die Charakterisierung der Nukleinsäureinteraktion von NC-Proteinen eingesetzt (Bombarda *et al.*, 1999; Mely *et al.*, 1995; Urbaneja *et al.*, 2000; Vuilleumier *et al.*, 1999). Sie ist möglich, da der einzige Trp-Rest von NC, nämlich Trp37, einen Teil des Nukleinsäurebindungsmotivs darstellt und somit direkt an der Bindung beteiligt ist (De Guzman *et al.*, 1998) (vergleiche Abb. I.1). Seine Fluoreszenzintensität wird durch die Interaktion spezifisch abgeschwächt, da ein Teil der Tryptophanfluoreszenz von der gebundenen Nukleinsäure absorbiert wird (Quench-Effekt).

III.4.2.1 Titration mit einem 6mer unspezifischer Sequenz

Um das System so einfach wie möglich zu halten, wurden zunächst nur kurze Oligonukleotide mit einer Länge von 6 Basen und einer zufällig ausgewählten Sequenz (GGCTAG) in Titrationsexperimenten verwendet. Da die Größe der NC-Bindungsstelle auf 5 bis 8 Nukleotide eingegrenzt wurde (Bombarda *et al.*, 1999; Khan & Giedroc, 1994; Mely *et al.*, 1995; You & McHenry, 1993), sollte ein 6mer die Bindung nur eines Proteinmoleküls erlauben. Untersuchungen bezüglich der minimal möglichen Oligonukleotidlänge zeigten, daß 5 Basen für das Zustandekommen einer stabilen Bindung ausreichend sind (Fisher *et al.*, 1998). Zu bestimmten Konzentrationen an vorgelegtem Protein wurden, bei 20°C und in Gegenwart von 100 oder 180 mM NaCl, Aliquots einer 100 µM 6mer-Lösung titriert (Abb. III.1). Die gemittelten Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Titrationsstufen wurden gegen die entsprechende Konzentration an Oligonukleotid aufgetragen, wodurch die in Abb. III.2 exemplarisch ausgewählten Titrationskurven entstanden. Titriert man NC hingegen mit TE-Puffer, kann keine Signalveränderung festgestellt werden. Erwartungsgemäß bleibt das Fluoreszenzsignal ebenfalls unverändert wenn CA aus HIV-1 (siehe III.1.2) - einem Protein ohne Nukleinsäurebindungsstelle - mit Oligonukleotiden titriert wird (Daten nicht gezeigt).

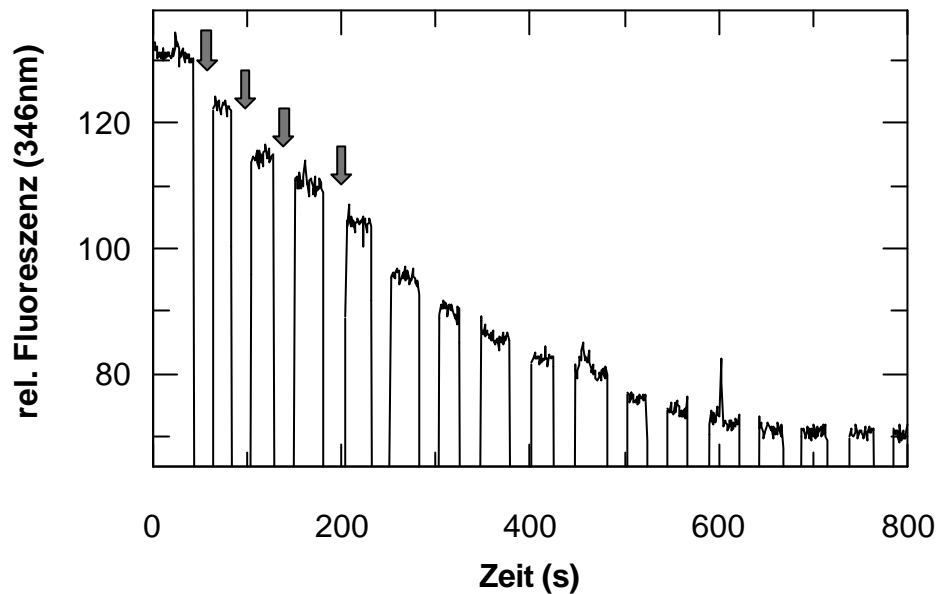


Abb. III.1: Rohdaten einer Tryptophan-Quench Titration von 200 nM NC. Die Titration wurde bei 20°C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.04% PEG 20000 und 2 mM DTT durchgeführt und nach Anregung bei 295 nm bei 346 nm verfolgt. Als Titrant wurde ein DNA-6mer eingesetzt (GGCTAG). Die Zeitpunkte der ersten 4 Titrationen sind durch graue Pfeile dargestellt.

Als weitere Kontrolle zur Überprüfung der Spezifität des Fluoreszenzsignals für die Komplexbildung von Protein und Oligonukleotid, wurden Messungen von NC in Gegenwart des Enzyms Phosphodiesterase (PDE) durchgeführt, oder die Reaktion nachträglich mit PDE versetzt. Die PDE katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phosphodiestern, führt also zum Abbau von Oligonukleotiden in die einzelnen Nukleotide. Wie erwartet, kam es in Anwesenheit der PDE durch Nukleinsäurezugabe zu keinem Signalabfall. Nach vollständiger Sättigung von NC mit Nukleinsäuren führt die PDE-Zugabe ebenfalls zur Wiederherstellung der Ursprungsfluoreszenzintensität. Wird dem System hingegen hitzeinaktivierte PDE zugeführt, wird der normale Titrationsverlauf nicht gestört (Daten nicht gezeigt). Nachdem die Spezifität des Signals gezeigt war, mußten die Stöchiometrien der entstandenen Komplexe bestimmt werden. Da die Genauigkeit der graphischen Bestimmung von Stöchiometrien in Konzentrationsbereichen die weit über dem K_d -Wert liegen größer ist, wurden sie aus Messungen bei hohen Proteinkonzentrationen (1000 nM) und niedrigem Salzgehalt (100 mM) abgeleitet (siehe II.5.2.3; Abb. III.2, kleine Bilder). Die graphische Inspektion der Daten ergab erwartungsgemäß eine Stöchiometrie von 1:1 für alle Protein/6mer-Komplexe (Vuilleumier *et al.*, 1999). Analyse der Titrationskurven entsprechend eines 1:1-Bindungsmodells resultierte in den in Abb. III.2 abgebildeten Fitkurven und den in Tab. III.1 aufgeführten Dissoziationskonstanten.

Protein	100mM NaCl		180mM NaCl	
	K_d (nM)	Amplitude (%)	K_d (nM)	Amplitude (%)
NC	124 ± 11	44.7 ± 9	493 ± 43	38.7 ± 9
CA146NC	82 ± 7	43.0 ± 15	468 ± 18	46.0 ± 14
CA-NC-SP2	287 ± 23	25.9 ± 2	586 ± 35	16.8 ± 4
Δ MA-CA-NC-SP2	113 ± 5	26.3 ± 2	556 ± 42	20.0 ± 4

Tab. III.1: Dissoziationskonstanten (K_d) mit den aus den Anpassungen bestimmten Standardabweichungen für die in Abb. III.2 und Abb. III.3 abgebildeten Messungen bei 100 mM beziehungsweise 180 mM NaCl. Jede Messung wurde mindestens viermal wiederholt. Die Amplituden sind Mittelwerte dieser Messungen mit ihren Standardabweichungen.

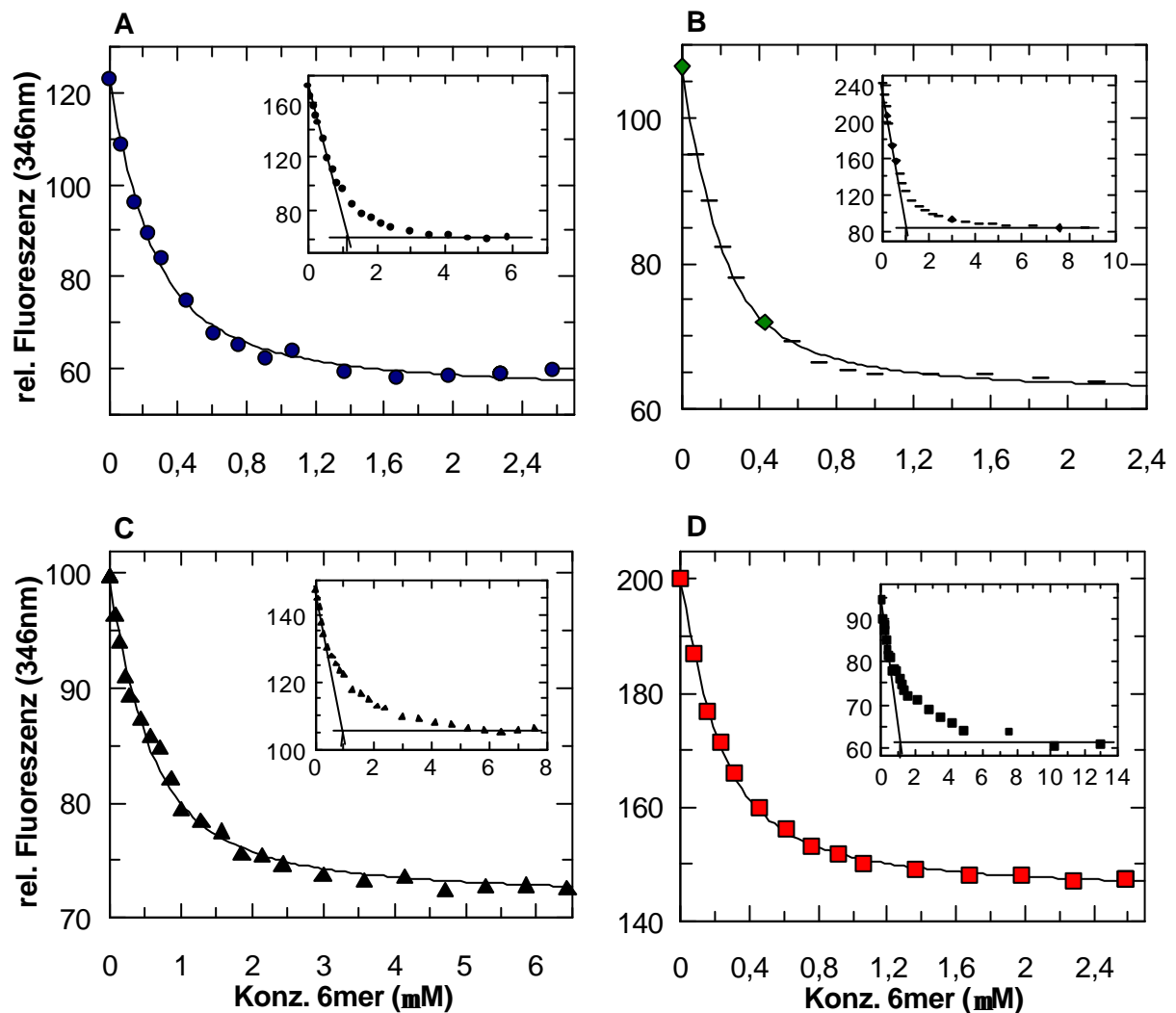


Abb. III.2: Tryptophan-Quench Titrations von NC (•) (A), CA146NC (◦) (B), CA-NC-SP2 (▲) (C) und DMA-CA-NC-SP2 (◄) (D) mit einem 6mer unspezifischer Sequenz in Gegenwart von 100 mM NaCl. Titrations wurden bei 20°C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.04% PEG 20000 und 2 mM DTT durchgeführt. Als Titrant wurde ein DNA-6mer eingesetzt (GGCTAG). In Messungen zur K_d -Wert-Bestimmung wurden 200 nM Protein vorgelegt, außer 500 nM im Fall von CA-NC-SP2. Die Daten wurden entsprechend eines 1:1-Bindungsmodells angepaßt (—). Stöchiometrische Titrations (kleine Bilder) wurden bei 1000 nM Protein durchgeführt. Die Anfangs- und Sättigungsbereiche wurden linear extrapoliert. Das Lot auf die x-Achse im Schnittpunkt der Geraden liefert die Stöchiometrie des Komplexes.

Die für den NC/6mer-Komplex bestimmte Dissoziationskonstante von 124 nM liegt in der gleichen Größenordnung, wie für dieses Protein in Anwesenheit von 100 mM NaCl bereits beobachtet. Vorangegangenen Tryptophanfluoreszenz-Messungen zufolge wurden für NC mit DNA-6meren unterschiedlicher Sequenz K_d -Werte zwischen 143 μ M (d(AAAAAA)) und 141 nM (d(TGTGCC)) bestimmt (Vuilleumier *et al.*, 1999). Insgesamt ist auffällig, daß NC, CA146NC und Δ MA-CA-NC-SP2, bei beiden Salzkonzentrationen, ähnliche Affinitäten für das 6mer besitzen (Tab. III.1). Nur das Protein CA-NC-SP2 fällt mit seinem K_d -Wert von 287 nM etwas aus dem Rahmen. Möglicherweise ist diese verminderte Affinität jedoch auf eine Fehleinschätzung der Konzentration an aktivem Protein zuzuschreiben.

Insgesamt tragen alle in den Proteinen vorkommenden Trp-Reste zur Fluoreszenzintensität bei. Da jedoch die Nukleinsäurebindung nur die Fluoreszenz eines Trp-Rests beeinflusst, wird bei Proteinen mit mehreren Tryptophanen nur ein kleiner Anteil der Gesamtfluoreszenzintensität abgeschwächt. Erwartungsgemäß sind daher die Amplituden von CA-NC-SP2 und Δ MA-CA-NC-SP2, die beide sieben Tryptophanreste enthalten, deutlich kleiner als die der beiden anderen Proteine mit zwei (CA146NC) und einem (NC) Trp (Tab. III.1). Im Gegensatz zu den Dissoziationskonstanten zeigen die Amplituden kein Ionenstärke-abhängiges Verhalten (Tab. III.1). Vermutlich übt also die Salzkonzentration keinen Einfluß auf die Art der Interaktionen des Trp37 im NC/Nukleinsäurekomplex aus (Vuilleumier *et al.*, 1999). Die aus Titrationsexperimenten in Gegenwart von 180 mM NaCl resultierenden K_d -Werte spiegeln gegenüber den aus den 100 mM-Messungen gewonnenen Werten mit ihrer Steigerung um das 4 bis 5fache eine für Protein-Nukleinsäure Wechselwirkungen typische Salzabhängigkeit wieder (Record *et al.*, 1976).

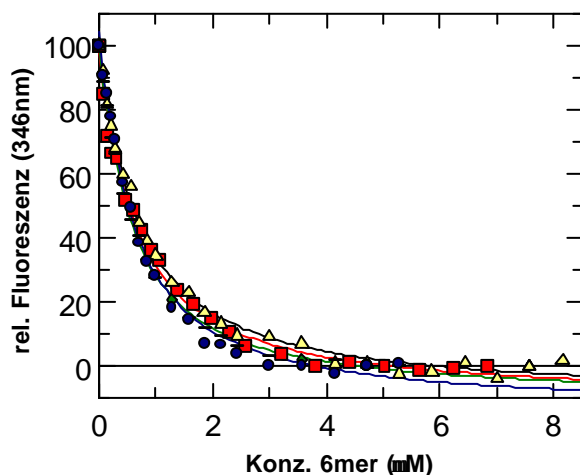


Abb. III.3: Tryptophan-Quench Titrationen von NC (○), CA146NC (□), CA-NC-SP2 (▲) und Δ MA-CA-NC-SP2 (◊) mit einem 6mer unspezifischer Sequenz in Gegenwart von 180 mM NaCl. Titrationen wurden bei 20°C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 180 mM NaCl, 0.04% PEG 20000 und 2 mM DTT durchgeführt. Als Titrant wurde ein DNA-6mer eingesetzt (GGCTAG). In allen Messungen wurden 200 nM Protein vorgelegt. Die relative Fluoreszenz wurde prozentual wiedergegeben. Die Daten wurden entsprechend eines 1:1-Bindungsmodells angepaßt (—).

Wie in Abb. III.3 gezeigt ist, verhalten sich alle vier Proteine unter diesen Bedingungen im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich. Die Komplexbildung mit kurzen Oligonukleotiden unspezifischer Sequenz ist also unabhängig vom Prozessierungsgrad von NC.

III.4.2.2 Titration mit SL3 und SL3-abgeleiteten Sequenzen des HIV RNA-Verpackungssignals

Da die Affinitäten Gag-abgeleiteter Proteine zu unspezifischen Nukleinsäuren unabhängig vom Reifungszustand der NC-Domäne sind, sollte im Folgenden getestet werden, wie sich diese Proteine gegenüber strukturierten Nukleinsäuren verhalten, die als Teil des HIV-Verpackungssignals (ψ) für die spezifische Interaktion des HIV-Genoms mit NC verantwortlich sind. Es wurde das DNA Analogon zur ψ -SL3-RNA (dSL3-WT), aber auch die ψ -SL3-RNA selbst (rSL3-WT), sowie eine davon abgeleitete Mutante (rSL3-AA) als Titranten in Tryptophanfluoreszenz-Messungen bei 180 mM NaCl und 20°C gewählt (siehe III.4.2.1 ; Abb. III.1).

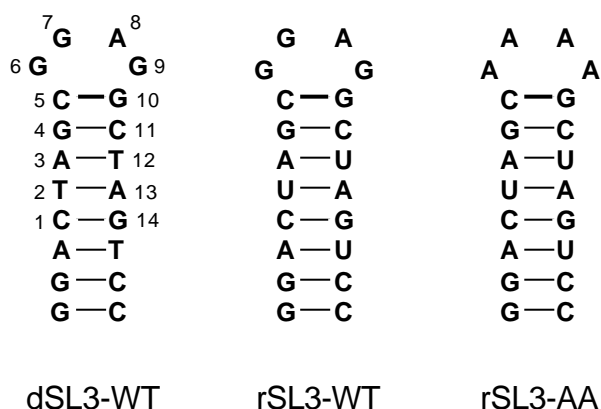


Abb. III.1: Nukleinsäuresequenz der als Haarnadelschleifen strukturierten SL3-abgeleiteten 20mere. Die Nummerierung der Nukleotide entspricht der in De Guzman *et al.*, 1998 und beginnt und endet an dem ersten bzw. letzten HIV-1-spezifischem Nukleotid. Die Basenpaarungen sind durch Striche angezeigt. „d“ steht für DNA, „r“ für RNA.

SL3 ist das dritte der vier Haarnadelstrukturelemente, die das HIV-Verpackungssignal aufbauen und hat verglichen mit den anderen die am stärksten konservierte Sequenz unter verschiedenen HIV-Stämmen (Abb. I.2) (Hayashi *et al.*, 1993). Koppelung von SL3 an heterologe RNAs ist außerdem ausreichend, um diese in Virus-ähnliche Partikel zu verpacken (Hayashi *et al.*, 1992). Die Spezifität der Interaktion zwischen NC und dem SL3 wurde des weiteren durch die NMR-Struktur des NC/SL3-Komplexes verifiziert (De Guzman *et al.*, 1998). Beide NC-Zn-Finger gehen besonders feste Bindungen mit G⁷ und G⁹ der G⁶-G⁷-A⁸-G⁹-Vierfachscheife ein (Abb. III.1). In der Mutante rSL3-AA sind alle Basen der Vierfachscheife gegen Adenine ausgetauscht. Da in Bindungsstudien mit kurzen Homopolymeren gezeigt werden konnte, daß NC die schwächste Bindung mit Adenine eingeht (Fisher *et al.*, 1998; Vuilleumier *et al.*, 1999), sollte die Interaktion von NC-haltigen Proteinen mit dem rSL3-AA einer unspezifischen Nukleinsäurebindung entsprechen. Die in dieser

Arbeit verwendeten SL3-Sequenzen bestehen aus 20, anstelle von 14 Nukleotiden, da der gepaarte Bereich zur Erhöhung der Stabilität um 3 Basenpaare verlängert ist (Abb. III.1).

Insgesamt soll auf drei Aspekte eingegangen werden: 1) Wie stark weichen die Affinitäten der Proteine gegenüber spezifischen (rSL3-WT oder dSL3-WT), verglichen mit unspezifischen (rSL3-AA oder DNA-6mer) Ribonukleinsäuren voneinander ab ? 2) Gibt es in der Interaktion von NC-haltigen Proteinen mit strukturierten Nukleinsäuren Unterschiede zwischen DNA und RNA ? 3) Wie unterscheiden sich die Proteine NC und Δ MA-CA-NC-SP2 in Ihrer Interaktion mit strukturierten Nukleinsäuren ?

Vorab soll noch angemerkt werden, daß NC mit diesen gefalteten SL3-Sequenzen Komplexe mit 1:1-Stöchiometrien eingeht. Dies war aus der NMR-Struktur und Titrationsstudien anderer Autoren ersichtlich (De Guzman *et al.*, 1998; Vuilleumier *et al.*, 1999). Das gleiche Stöchiometrieverhältnis konnte auch für Δ MA-CA-NC-SP2 mit den SL3-Sequenzen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt ist auch das Ausmaß der durch die Komplexbildung induzierten Fluoreszenzintensitätsabnahme beider Proteine vergleichbar mit den Amplituden der 6mer-Titrations (Tab. III.1 und Tab. III.1). Eine Ausnahme stellt die Bindung des wildtyp RNA-SL3 (rSL3-WT) an NC dar. In diesem Fall steigert sich die Amplitude um 20% gegenüber anderen NC/Nukleinsäure-Interaktionen. Vermutlich ist in dieser Wildtyp-Interaktion das Trp37 noch stärker zwischen den Basen interkaliert, was wiederum in einer größeren Fluoreszenzabnahme resultiert.

Oligonukleotid	Protein	K_d (nM)	Amplitude (%)
dSL3-WT	NC	96 ± 22	48.1 ± 4
	Δ MA-CA-NC-SP2	421 ± 104	18.4 ± 6
rSL3-AA	NC	287 ± 43	49.8 ± 2
	Δ MA-CA-NC-SP2	104 ± 39	17.5 ± 7
rSL3-WT	NC	3.2 ± 2.5	69.2 ± 1
	Δ MA-CA-NC-SP2	44 ± 25	20.0 ± 1

Tab. III.1: Dissoziationskonstanten (K_d) mit den aus den Anpassungen bestimmten Standardabweichungen für die in Abb. III.2 und Abb. III.3 abgebildeten Messungen bei 180 mM NaCl. Jede der Messungen wurde mindestens dreimal wiederholt. Die Amplituden sind Mittelwerte aus diesen Messungen mit ihren Standardabweichungen.

Vergleicht man die Interaktion von NC mit spezifischen (dSL3-WT) und unspezifischen (6mer, siehe III.4.2.1) Nukleinsäuren auf DNA-Basis, beobachtet man eine 5fache Affinitätssteigerung gegenüber der strukturierten Wildtypsequenz. Einen

Affinitätsunterschied gleichen Ausmaßes haben (Vuilleumier *et al.*, 1999) für die Paare NC-SP2/dSL3-WT und NC-SP2/dSL3-AA, also der spezifischen bzw. unspezifischen Bindung, mit zwei strukturierten DNA-Oligonukleotiden festgestellt. Auf der Basis von Ribonukleinsäuren ist die Affinität der rSL3-WT-Bindung von NC gegenüber der unspezifischen Assoziation mit dem rSL3-AA-Oligo um ca. das 10fache gestiegen. Die spezifische Bindung zwischen NC und rSL3-WT ist selbst in Gegenwart von 180 mM NaCl so fest, daß die Ungenauigkeit bei der Datenanpassung sehr groß ist (Tab. III.1). Vergleicht man die Interaktion von NC mit spezifischen Nukleinsäuresequenzen auf DNA (dSL3-WT)- oder RNA-Basis (rSL3-WT) miteinander, beobachtet man eine Affinitätssteigerung gegenüber Ribonukleinsäuren sogar um mehr als das 10fache (Abb. III.2, A). Obwohl NC offensichtlich mit Ribonukleinsäuren festere Bindungen eingeht, ist doch die Sequenz der Vierfachsleife ausschlaggebendes Kriterium für die Affinität der Interaktion, was in einem direkten Vergleich der K_d -Werte für die Komplexe aus dSL3-WT/NC und rSL3-AA/NC deutlich wird.

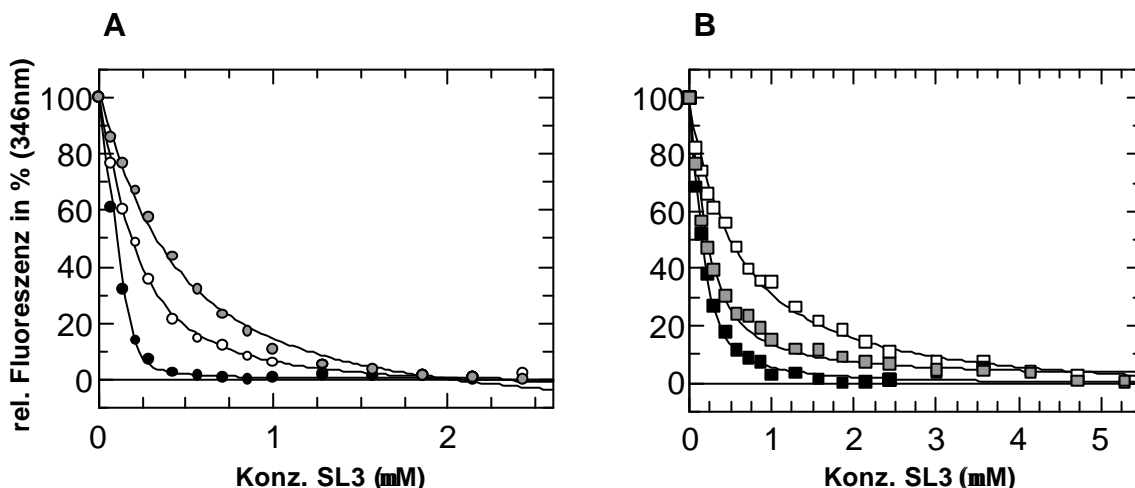


Abb. III.2: Tryptophan-Quench Titrationen von NC (—) (A) und DMA-CA-NC-SP2 (—) (B) mit SL3-abgeleiteten Sequenz in Gegenwart von 180 mM NaCl. Titrationen wurden bei 20°C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 180 mM NaCl, 0.04% PEG 20000 und 2 mM DTT durchgeführt. Als Titranten wurden die Haarnadelstrukturen dSL3-WT (weiße Symbole), rSL3-WT (schwarze Symbole) und rSL3-AA (graue Symbole) eingesetzt (Abb. III.1). In allen Messungen wurden 200 nM Protein vorgelegt. Die relative Fluoreszenz wurde prozentual wiedergegeben. Die Daten wurden entsprechend eines 1:1-Bindungsmodells angepaßt (—).

Überraschenderweise bleibt im Fall von Δ MA-CA-NC-SP2 die Affinität gegenüber dem DNA-SL3-Analogon und einem DNA-6mer unspezifischer Sequenz ohne ausgeprägte Sekundärstruktur nahezu gleich. Wurde jedoch eine strukturierte Ribonukleinsäure (rSL3-AA) als Bindungspartner angeboten, konnte eine Affinitätssteigerung um mehr als das 5fache beobachtet werden (Abb. III.2, B). Vergleicht man die beiden Nukleinsäuren mit spezifischer Sequenz (dSL3-WT und rSL3-WT) direkt miteinander, zeigte Δ MA-CA-NC-SP2 eine um ca. das 10fache

gesteigerte Affinität gegenüber dem RNA-SL3. Daraus kann geschlossen werden, daß Δ MA-CA-NC-SP2 stärker zwischen Nukleinsäuretypen als zwischen Nukleinsäuresequenzen diskriminiert.

Insgesamt zeigen sowohl NC, als auch Δ MA-CA-NC-SP2 jeweils die höchsten Affinitäten gegenüber dem rSL3-WT. Bezogen auf die Dissoziationskonstanten, die für die Interaktion mit dem DNA-Analogon des SL3 bestimmt wurden, nimmt bei beiden Proteinen die Affinität gegenüber dem rSL3-WT um mehr als das 10fache zu. Allerdings geht das prozessierte NC, verglichen mit Δ MA-CA-NC-SP2, sowohl mit dem DNA-, als auch mit dem RNA-SL3-WT eine festere Bindung ein (Abb. III.3). Ein weiterer Unterschied liegt in der Art der Interaktion beider Proteine. So scheint Δ MA-CA-NC-SP2 weniger zwischen den angebotenen Sequenzen, als zwischen DNA und RNA zu differenzieren.

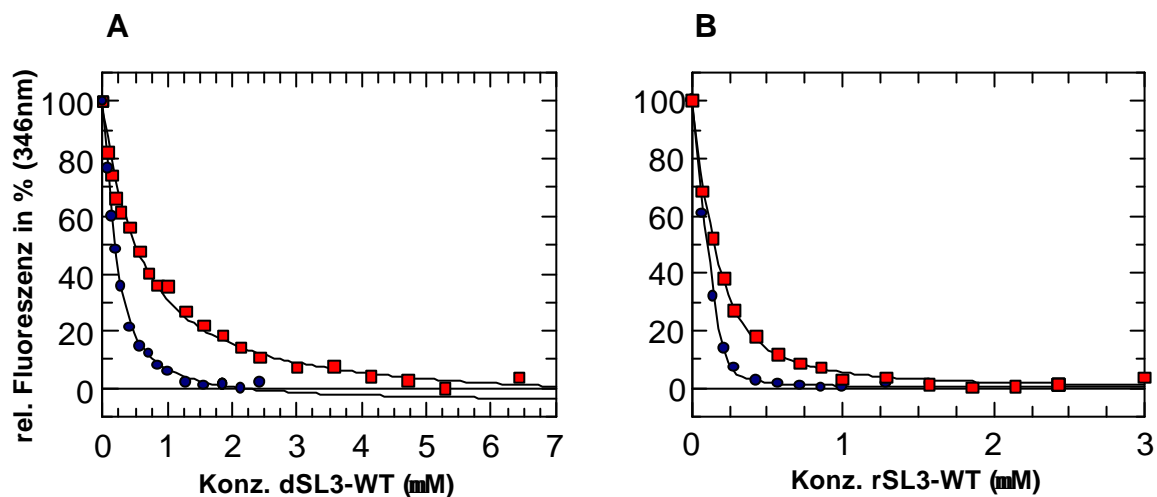


Abb. III.3: Gegenüberstellung der Tryptophan-Quench Titrationen von NC (-) und DMA-CA-NC-SP2 (<) mit der DNA (A), oder RNA (B) SL3-wildtyp Sequenz in Gegenwart von 180 mM NaCl. Titrationen wurden bei 20°C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 180 mM NaCl, 0.04% PEG 20000 und 2mM DTT durchgeführt. In allen Messungen wurden 200 nM Protein vorgelegt. Die relative Fluoreszenz wurde prozentual wiedergegeben. Die Daten wurden entsprechend eines 1:1-Bindungsmodells angepaßt (—).

III.4.3 FRET-Titration eines dansylierten Oligonukleotids

Nach der Charakterisierung von 1:1-Komplexen Gag-abgeleiteter Proteine mit Nukleinsäuren, sollte nun ihre Interaktion mit längeren Oligonukleotiden untersucht werden. Dies ist mit Tryptophanfluoreszenz-Messungen nicht einfach möglich, da durch die Titration einer konstanten Proteinmenge mit einem Oligonukleotid mit mehreren Bindungsstellen, nicht nur Sättigung auf Grund der Bildung von 2:1-Komplexen (Protein/Oligo) erreicht werden kann, sondern auch durch 1:1-Komplexe, oder einer Mischung beider Spezies. Um dieses Problem zu umgehen, wurde der Versuchsaufbau umgekehrt: Einer vorgelegten Konzentration an Nukleinsäure wurden nun Aliquots an Protein zugeführt. Es wurden zwar noch immer die

Tryptophanreste der hinzu titrierten Proteinmoleküle angeregt, aber als Signal für die Komplexbildung wurde nicht mehr die Abnahme der Tryptophanfluoreszenz verfolgt, sondern die Übertragung ihrer Fluoreszenzresonanzenergie auf Dansylgruppen, welche an das 5'-Ende der vorgelegten Oligonukleotide gekoppelt waren (siehe II.5.2.4). Als Oligonukleotid wurde ein DNA-16mer (DN16) mit der unspezifischen Sequenz GGCTAGAAGGATCCAT eingesetzt, welches auf Grund seiner Länge und angesichts einer NC-Bindungsstelle von 5 bis 8 Nukleotiden (Bombarda *et al.*, 1999; Khan & Giedroc, 1994; Mely *et al.*, 1995; You & McHenry, 1993) vermutlich die Bindung von zwei Proteinmolekülen pro Oligonukleotid ermöglicht. Da die Effizienz des Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET) stark vom Abstand der beiden Fluorophore abhängig ist, sollte eine FRET-induzierte Intensitätszunahme nur bei Komplexbildung zwischen Protein und dansylierter Nukleinsäure zu beobachten sein. Tatsächlich konnte bei Titration von DN16 mit NC ein Anstieg der für Dansyl spezifischen Fluoreszenz bei 530 nm verfolgt werden. Die Rohdaten einer typischen Titration mit NC bei 180 mM NaCl und 20°C sind in Abb. III.1 gezeigt. Um die Spezifität des FRET-Signals zu überprüfen, wurde nach Erreichen der Sättigung, mit unmarkiertem 16mer titriert. Die FRET-induzierte Änderung des Fluoreszenzsignals war durch diese direkte Konkurrenz vollständig reversibel.

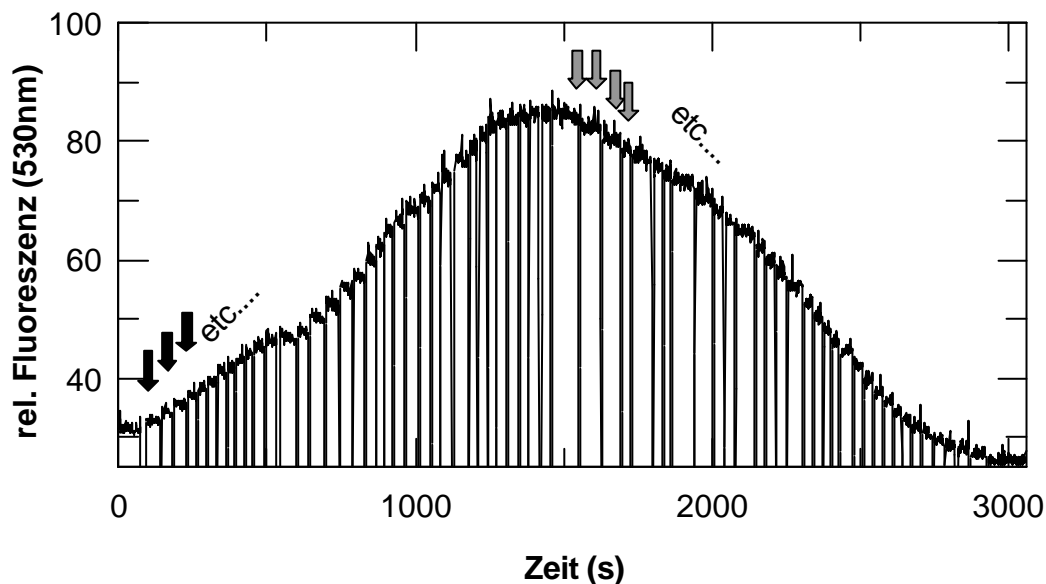


Abb. III.1: Rohdaten einer FRET Titration. Es wurden 150 nM eines dansylierten DNA-Oligonukleotids einer Länge von 16 Basen und unspezifischer Sequenz (GGCTAGAAGGATCCAT) in 50 mM HEPES, pH 7.5, 180 mM NaCl und 2 mM DTT vorgelegt und mit NC-SP2 titriert. Das FRET-Signal wurde nach Anregung des Proteins bei 280 nm im Emissionsmaximum von Dansyl bei 530 nm verfolgt. Die Zeitpunkte der ersten 3 Titrationen mit NC sind exemplarisch durch schwarze Pfeile dargestellt. Nach Erreichen der Sättigung wurde mit unmarkiertem 16mer kompetitiert (graue Pfeile).

Der Vergleich von NC-Titrationskurven, die bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen aufgenommen wurden, verdeutlicht die Abhängigkeit der Reaktion von der Ionenstärke (Abb. III.2).

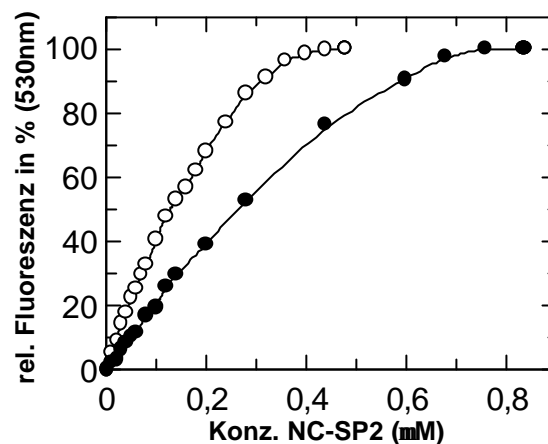


Abb. III.2: NaCl-Abhängigkeit des FRET Signals. 100 nM dansyliertes 16mer wurden mit NC-SP2 in Gegenwart von 100 mM (○) oder 180 mM (●) NaCl in 50 mM HEPES, pH 7.5, 180 mM NaCl und 2 mM DTT bei 20°C titriert. Die relative Fluoreszenz wurde prozentual wiedergegeben. Die durchgezogenen Linien stellen keine Anpassungen dar, sondern dienen nur zur Orientierung.

Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für die Wechselwirkung Gag-abgeleiteter Proteine mit dem 6mer gezeigt (siehe III.4.2.1) und ist für Protein/Nukleinsäure-Interaktionen zu erwarten (Record *et al.*, 1976). Einen weiteren Beweis für die direkte Korrelierbarkeit von beobachteter Fluoreszenzänderung und Komplexbildung der beiden Partner lieferten Kontrollexperimente in Gegenwart des nukleinsäureabbauenden Enzyms Phosphodiesterase (PDE). Wurde PDE nach Erreichen der Sättigung zugegeben, konnte ein Signalabfall beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich führt der enzymatische Oligonukleotid-Verdau zur Auflösung der gebildeten Komplexe. Außerdem konnte unter Verwendung des Proteins Δ MA-CA, welchem die nukleinsäurebindende NC-Domäne fehlt (siehe III.3) (zur Verfügung gestellt von Ingolf Gross), kein FRET-Signal mit dansylierten Nukleinsäuren induziert werden (Daten nicht gezeigt). Zugabe von Protein ist also erwartungsgemäß alleine nicht ausreichend um FRET zu erzeugen.

Ein Vergleich der FRET-Titrationskurven der vier Gag-abgeleiteten Proteine NC-SP2, CA146NC, CA-NC-SP2 und Δ MA-CA-NC-SP2 zeigt, daß sich ihr Nukleinsäurebindungsverhalten an Oligonukleotide mit mehr als einer Bindungsstelle stark unterscheidet (Abb. III.3). Je kürzer das Protein ist, um so höher ist dessen Affinität zu dem 16mer unspezifischer Sequenz. N-terminal verlängerte Proteine benötigen also höhere Proteinkonzentrationen um das 16mer zu sättigen. Unter der Anwendung eines globalen Fit Algorithmus wurde versucht die Bindungseigenschaften von NC-SP2, CA-NC-SP2 und Δ MA-CA-NC-SP2 zu quantifizieren. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des dansylierten 16mers mit den einzelnen Proteinen titriert (Abb. III.36).

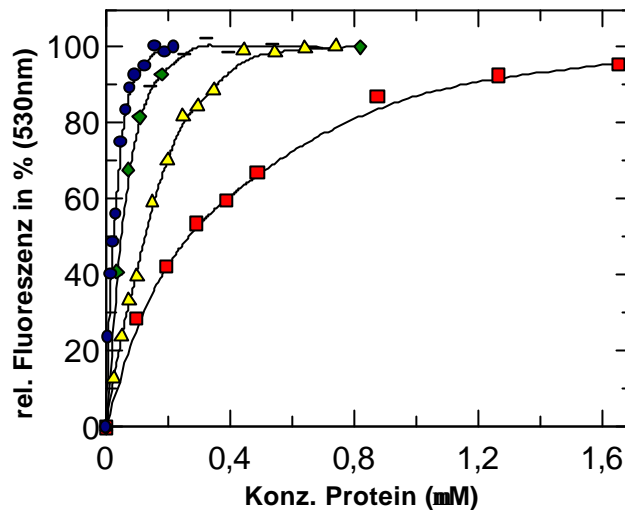


Abb. III.3: FRET Titrationsen von einem 16mer unspezifischer Sequenz mit NC (-), CA146NC (-), CA-NC-SP2 (▲) und DMA-CA-NC-SP2 (-) in Gegenwart von 100 mM NaCl. Titrationsen wurden bei 20°C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl und 2 mM DTT durchgeführt. In allen Messungen wurden 50 nM des dansylierten 16mers vorgelegt. Die relative Fluoreszenz wurde prozentual wiedergegeben. Die durchgezogenen Linien stellen keine Anpassungen dar, sondern dienen nur zur Orientierung.

Die Titrationsdaten von Δ MA-CA-NC-SP2 zeigen einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Hierfür gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten der Interpretation: a) es binden zwei Proteinmoleküle mit unterschiedlichen K_d -Werten und, oder unterschiedlichen Fluoreszenzausbeuten an das 16mer, b) der Nukleinsäurebindung gehen Proteindimerisierungs- bzw. Multimerisierungsgleichgewichte voraus oder c) es besteht eine Kombination der Fälle a) und b). Aus den mittels der dynamischen Lichtstreuung erhobenen Daten (siehe III.3.5) ist zu entnehmen, daß das Protein Δ MA-CA-NC-SP2 vermutlich nie als monodisperse Lösung vorliegt. Selbst bei niedrigen Konzentrationen wurden Proteinkomplexe höherer Ordnung identifiziert. Eine mathematische Interpretation eines so komplexen Systems ist schwer möglich. Um trotzdem einen Hinweis auf die Nukleinsäurebindungseigenschaften der Proteine zu bekommen wurden die potentiellen Protein-Protein-Gleichgewichte vernachlässigt und jeweils der gesamte Datensatz (aus vier Messungen) unter der Annahme a) angepaßt (siehe II.5.2.4; Thomä, N., persönliche Mitteilung). Als Bindungsmodell wurde also eine sequentielle Gleichgewichtsbindung zweier Proteinmoleküle an das Oligonukleotid zugrunde gelegt. Vermutlich induziert die erste Bindung auf Grund der zu diesem Zeitpunkt noch bestehenden freien Beweglichkeit des Proteinmoleküls entlang des nur an seinem 5'Ende mit Dansyl markierten 16mers nur eine kleine Fluoreszenzänderung. Durch die Bindung des zweiten Moleküls, wird eines der beiden in direkter Nachbarschaft zur Dansyl-Markierung fixiert, was wiederum eine größere Fluoreszenzänderung zur Folge hat.

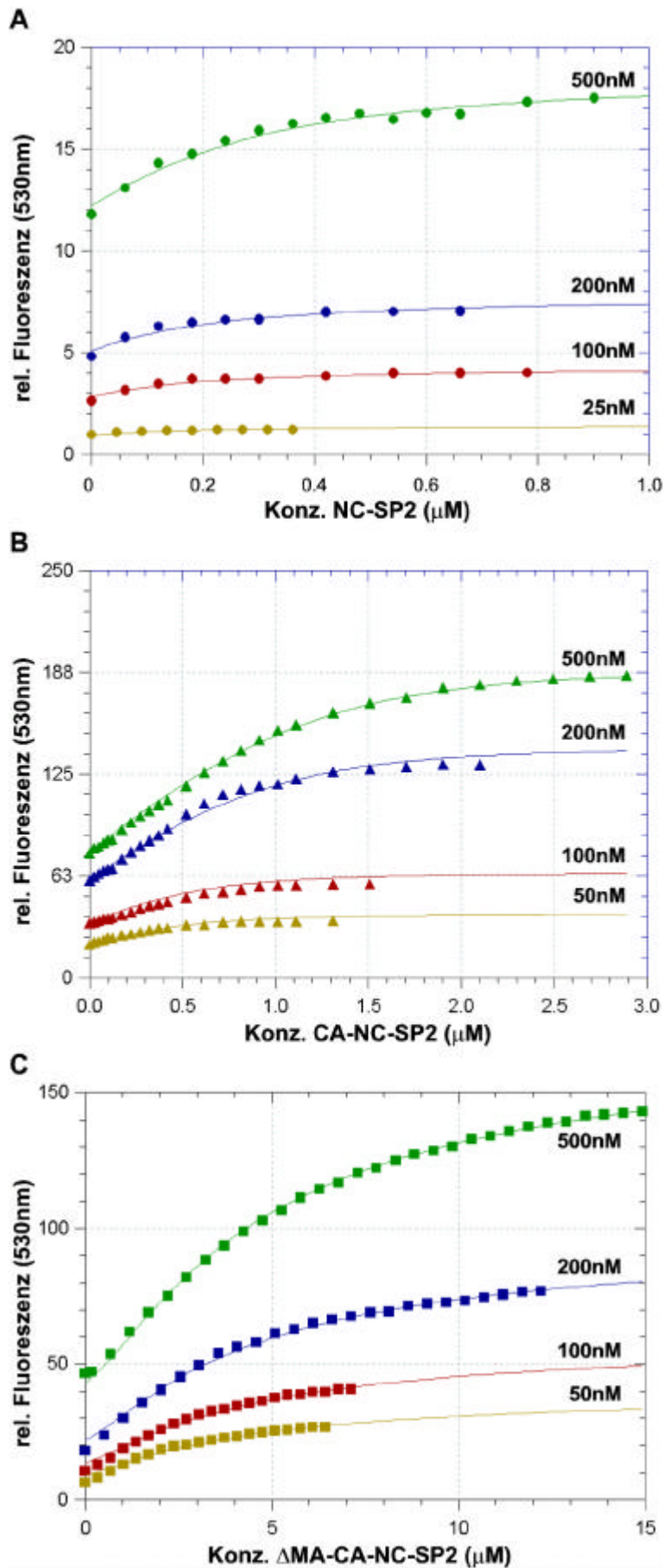


Abb. III.4: FRET Titrationskurven von einem 16mer unspezifischer Sequenz mit NC (·) (A), CA-NC-SP2 (\blacktriangle) (B) und DMA-CA-NC-SP2 (<) (C) in Gegenwart von 180 mM NaCl. Bei den Messungen wurden die angezeigten Konzentrationen des dansylierten 16mers vorgelegt. Titrations wurden bei 20°C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 180 mM NaCl und 2 mM DTT durchgeführt. Jeder Datensatz wurde entsprechend eines 2:1-Bindungsmodells (Protein/Oligo) mittels eines globalen Fit Algorithmus angepaßt (—).

Auf Grund der Länge des vorgelegten Oligonukleotids kann auch bei den Proteinen NC-SP2 und CA-NC-SP2 von zwei Bindungsereignissen ausgegangen werden, obwohl sich bei diesen Proteinen die Fluoreszenzausbeuten der einzelnen Bindungen nicht in ihrem Ausmaß unterscheiden. Generell ist die Intensität von FRET-Signalen nicht nur von der Distanz der beiden Fluorophore, sondern auch von ihrer Orientierung zueinander und ihrer molekularen Umgebung abhängig. Δ MA-CA-NC-SP2 muß sich also in den letzten beiden Punkten von den anderen Proteinen unterscheiden. Die aus den Tryptophanfluoreszenz-Messungen ermittelten Dissoziationskonstanten für die Interaktion der jeweiligen Gag-abgeleiteten Proteine mit dem unspezifischen 6mer wurden in dem globalen Fit als Grundlage für das erste Bindungsgleichgewicht angegeben (siehe III.4.2.1). Das Ergebnis der Datenanpassung ist graphisch (Abb. III.36), sowie tabellarisch dargestellt (Tab. III.1).

Protein	K_d (nM) der ersten Bindung	K_d (nM) der zweiten Bindung
NC-SP2	200-500	200-500
CA-NC-SP2	500-700	900-1100
Δ MA-CA-NC-SP2	700-1000	3200-3600

Tab. III.1: Dissoziationskonstanten (K_d) für die erste und zweite Bindung der in (Abb. III.36) abgebildeten Messungen bei 180 mM NaCl. Jede der Messungen wurde mindestens dreimal wiederholt. Die Daten wurden in einer globalen Fit Prozedur an ein 2:1-Bindungsmodell (Protein:Oligo) angepaßt.

Die zu den einzelnen Dissoziationskonstanten angegebenen Größenordnungsbereiche spiegeln den Grad der Bestimmung des System wider. Daher sind die für die Interaktion mit DN16 beobachteten Dissoziationskonstanten als apparente Werte, nicht aber als absolute Angaben zu werten. Es ist jedoch auffällig, daß sich die Affinitäten für die zweite Bindung in Δ MA-CA-NC-SP2-Komplexen um mehr als das 10fache von denen der NC-SP2-Komplexe unterscheiden. Um zu zeigen, daß dieser Unterschied nicht einfach in unterschiedlichen Bedürfnissen der Proteine für die Größen der Nukleinsäurebindungsstelle begründet liegt, also für Δ MA-CA-NC-SP2 das 16mer nicht schlicht zu kurz für die Bindung zweier Proteinmoleküle ist („end-effect“), wurde das 16mer um vier Nukleotide erweitert und die Experimente mit dem 20mer (DN20mer: GGCTAGAAGGATCCATATCT) wiederholt. Für Δ MA-CA-NC-SP2 und NC-SP2 ergaben sich für die Interaktion mit dem 20mer ähnliche Kurvenverläufe (sigmoidal im Fall von Δ MA-CA-NC-SP2) und Dissoziationskonstanten (Daten nicht gezeigt). Dem unterschiedlichen Bindungsverhalten Gag-abgeleiteter Proteine an dansylierte 16mere müssen also andere, dem jeweiligen Protein inhärente Ursachen zugrunde liegen. Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß N-terminale Verlängerungen von

NC dessen Nukleinsäurebindungseigenschaften beeinflussen, was bei dem fast vollständigen Gag-Protein Δ MA-CA-NC-SP2 zu einer Art negativen Kooperativität der Bindung führt, während die beiden Bindungsereignisse von NC unabhängig voneinander mit den gleichen Dissoziationskonstanten ablaufen.

III.4.4 Isothermale Titrationskalorimetrie Gag abgeleiteter Proteine

Eine weitere Möglichkeit, die Interaktion zweier Moleküle zu studieren, ist die Anwendung der isothermalen Titrationskalorimetrie. Diese hochsensitive Methode birgt den Vorteil, daß sich die thermodynamischen Parameter, welche mit der Interaktion assoziiert sind, direkt aus der Messung ergeben. Die auf diese Weise nochmals unabhängig bestimmten Dissoziationskonstanten sollten zur Verifizierung der aus spektroskopischen Messungen resultierenden K_d -Werte herangezogen werden. Tatsächlich gemessen wird die eingebrachte Wärmeleistung ($\mu\text{cal/s}$), die benötigt wird um eine Referenzzelle und eine Probenzelle bei jedem Titrationsschritt auf konstanter Temperatur zu halten. Das Protein wurde bei 20°C und 180 mM NaCl vorgelegt und ein in identischem Puffer gelöstes DNA-6mer (GGCTAG) oder DNA-16mer (GGCTAGAAGGATCCAT) hinzu titriert. Die Rohdaten einer typischen 6mer-Titration von NC, einer exothermen Reaktion, sind in Abb. III.1, A (oben) dargestellt. Je mehr 6mer zugegeben wurde, um so mehr wurden die freien Bindungsstellen des Proteins gesättigt, bis am Ende nur noch der Beitrag der in diesem Fall endothermen Verdünnungswärme durch die Titration zu sehen ist. Die Integration der Wärmeleistung ergibt die Bindungswärmen jeder einzelnen Injektion. Diese sind pro mol an zugeführtem 6mer in Abb. III.1, A (unten) gezeigt. Auswertung der Daten (siehe II.5.6) lieferte ein Verhältnis N gleich 6mer/NC von 0.72, was im Rahmen der Meßgenauigkeit als 1:1-Stöchiometrie interpretiert werden kann. Außerdem wurde eine kleine Änderung der Bindungsenthalpie ΔH von -11.3 kcal/mol und eine Gleichgewichtskonstante K von $7.7 \cdot 10^5 \pm 0.6 \cdot 10^5\text{ M}^{-1}$, entsprechend einer Dissoziationskonstante, K_d von $1.3 \pm 0.1\text{ }\mu\text{M}$ beobachtet. Die Betrachtung der NC/16mer-Interaktion mittels ITC liefert den in Abb. III.1, B dargestellten Verlauf, der sich von dem der NC-6mer-Titration stark unterscheidet. Es muß sich also mehr als ein Bindungsgleichgewicht einstellen. Datenanpassung mit zugrunde liegender 2:1-Stöchiometrie (Protein/Oligo) liefert zwei gleiche Dissoziationskonstanten von ca. $2\text{ }\mu\text{M}$, jedoch Bindungsenthalpien mit unterschiedlichen Vorzeichen. Allerdings wurde hier eine konstante Menge an Protein mit einem 16mer titriert, also einem Oligonukleotid mit mehr als nur einer Proteinbindungsstelle.

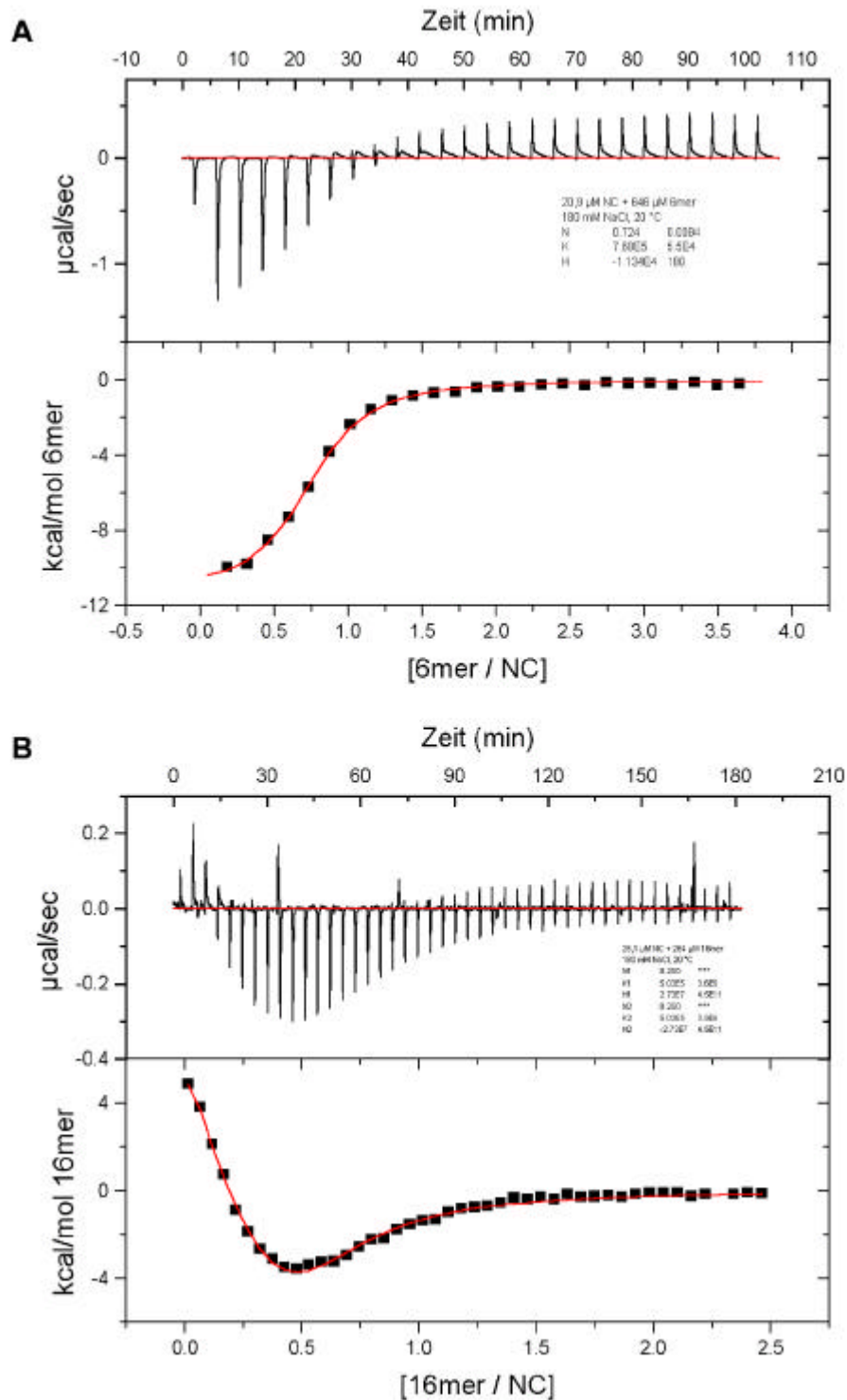


Abb. III.1: ITC-Daten von NC mit einem unspezifischen 6mer (A), oder 16mer (B). Titrations wurden bei 20°C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 180 mM NaCl und 2 mM DTT durchgeführt. In A) wurden 20.9 μM NC vorgelegt und mit einer 646 μM 6mer-Lösung titriert. In B) wurden 25.1 μM NC mit einer 264 μM 16mer-Lösung titriert. Oben sind jeweils die Rohdaten, unten die integrierten Bindungswärmen per mol an injiziertem Oligonukleotid gezeigt. Die Datensätze wurde entsprechend eines 1:1- (A) oder 2:1-Bindungsmodells (Protein/Oligo) (B) angepaßt (durchgezogene Linie; unten). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen angegeben.

Daher ist es möglich, daß transient gebildete 2:1-Komplexe durch Titration über den Sättigungspunkt hinaus aufgelöst wurden, also in der Messung mehr als zwei Bindungsgleichgewichte überlagert sind. Das Experiment müßte demnach mit dem Protein als Titrant und vorgelegtem 16mer wiederholt werden. Insgesamt ergibt sich für die NC/6mer-Interaktion bei 180 mM NaCl ein Unterschied in den K_d -Werten um Faktor zwei, je nach Art der Bestimmung (Tryptophanfluoreszenz- oder ITC-Messungen) (Tab. III.1). Da die Ergebnisse mit zwei sehr unterschiedlichen Methoden generiert wurden, ist diese Differenz im Toleranzbereich. Damit konnten die Tryptophanfluoreszenz-Daten bestätigt werden.

IV Diskussion

IV.1 CypA übt *in vitro* durch direkte Bindung an CA einen „Chaperon“-artigen Einfluß auf dessen Multimerisierungseigenschaften aus

Cyclophilin A (CypA) ist ein zelluläres Protein, welches spezifisch in HIV-1 Partikel verpackt wird und für dessen Replikation wichtig ist (Franke *et al.*, 1994; Luban *et al.*, 1993; Thali *et al.*, 1994; Welker *et al.*, 2000). Die Funktion, die CypA dabei erfüllt, ist noch nicht geklärt. Braaten *et al.* konnten jedoch zeigen, daß CypA eine Rolle in den frühen Prozessen nach Eintritt des Virus in die Zelle und vor der reversen Transkription spielt (Braaten *et al.*, 1996). Basierend auf der strukturellen Analyse von Kokristallen, welche stöchiometrische Mengen von CA(1-151) und CypA enthielten, wurde die Hypothese erstellt, daß CypA durch seine Bindung eine N-terminale CA/CA-Kontaktfläche blockiert (Gamble *et al.*, 1996). Bei den im Virion auftretenden Konzentrationsverhältnissen von 1:10 (CypA/CA) könnte CypA, durch Unterdrückung der CA/CA-Wechselwirkungen in jeder zehnten dieser Kontaktflächen, die Kapsidstabilität insgesamt vermindern. Bei der Infektion einer Zielzelle könnte diese Destabilisierung das Auseinanderfallen der Kapside erleichtern.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde nun der Effekt von CypA auf die Bildung und Stabilität von geordneten CA-Selbstassoziaten untersucht. Dazu wurde ein *in vitro* System benutzt, in dem sich gereinigtes CA Protein zu tubulären Partikeln zusammenlagert, welche dem reifen, konusförmigen HIV-1 Kapsid ähnlich sind (Gross *et al.*, 1997). In unserem Labor wurde bereits beobachtet, daß die Anwesenheit großer Mengen von CypA zu einer Unterdrückung der Zylinderbildung führt. Dieser Effekt kann durch gleichzeitige Zugabe von Cyclosporin, einem CypA-Inhibitor, wieder aufgehoben werden (Gross *et al.*, 1998).

Um den durch CypA induzierten Effekt auf die Assemblierung von CA Zylindern genauer zu charakterisieren, wurden HIV-1 CA Varianten mit eingeschränkter Fähigkeit, an CypA zu binden, hergestellt (Abb. III.1). Ihre Affinität gegenüber CypA sowie ihre Multimerisierungseigenschaften in Ab- bzw. Anwesenheit von CypA wurden analysiert. Zum Vergleich wurde auch CA von HIV-2 untersucht, da in HIV-2 Virionen weder CypA inkorporiert wird, noch ihre Bildung durch Cyclosporin inhibiert werden kann (Billich *et al.*, 1995; Franke *et al.*, 1994). Die Affinität von HIV-2 CA gegenüber CypA war, verglichen mit dem wildtyp HIV-1 CA-Protein, dementsprechend um Faktor 70 (von 30 auf 2124 μ M) reduziert (siehe Tab. III.1).

Der Austausch des hoch konservierten, innerhalb der CypA-Bindeschleife von wildtyp HIV-1 CA lokalisierten Gly89 gegen große hydrophobe Reste (Leu, Trp) oder Cystein hatte eine deutliche Erhöhung der K_d -Werte für die CypA-Interaktion zur Folge. Diese Proteine zeigten verglichen mit HIV-2 CA ähnliche Affinitäten gegenüber CypA (siehe Tab. III.1). In Übereinstimmung mit den niedrigeren Affinitäten *in vitro* inkorporierten auch HIV-1 Partikel, welche die hier beschriebenen CA Varianten enthielten, ca.85% weniger CypA (Wiegiers *et al.*, 1999). Etwas mehr CypA Inkorporation war im Fall der G89F Variante zu verzeichnen. Bei diesem CA Protein war auch die Affinität gegenüber CypA weniger stark reduziert (ca 13fach). Da auf Grund der Analyse der CA(1-151)/CypA-Kokristallstruktur (Gamble *et al.*, 1996) vergleichbare Effekte für alle Aminosäuren mit umfangreichen Seitenketten an Position 89 erwartet wurden, ist dieser Unterschied unter strukturellen Gesichtspunkten nicht leicht erklärbar. Generell korrelierten aber die *in vitro* bestimmten K_d -Werte der CA-Varianten gegenüber CypA mit den *in vivo* beobachteten Mengen an verpacktem CypA.

Alle Varianten des HIV-1 CA Proteins assoziierten *in vitro* zu tubulären Strukturen ähnlicher Morphologie, allerdings mit extrem unterschiedlicher Effizienz (Abb. III.1). Wir konnten außerdem zeigen, daß alle Viren, welche die entsprechend veränderten CA Proteine enthielten, in Zellkultur mit normaler Effizienz gebildet wurden und die extrazellulären Virionen in ihrer Kapsidmorphologie kaum verändert waren (Wiegiers *et al.*, 1999). So wurde für einige der Varianten, neben Kapsiden mit wildtyp-Morphologie, auch das Auftreten von Kapsiden mit kleinen Unregelmäßigkeiten in ihrer konusartigen Form beobachtet. Dieser Phänotyp könnte in Zusammenhang mit der verstärkten Heterogenität der Zylinderdurchmesser der *in vitro* gebildeten Partikel stehen. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse jedoch, daß die Fähigkeit von CA zur Selbstassoziation in geordnete kapsidähnliche Strukturen durch die Einführung der Aminosäureaustausche nicht aufgehoben wurde. Im Gegensatz dazu war CA von HIV-2 trotz seiner 70.5%igen Aminosäuresequenzidentität zu CA HIV-1 CA nicht dazu in der Lage, sich *in vitro* zu geordneten Strukturen zusammenzulagern (Abb. III.2). Daher konnte es nicht dazu herangezogen werden CypA-induzierte Effekte *in vitro* zu studieren.

Auf die Zusammenlagerung von wildtyp HIV-1 CA erzeugte die Anwesenheit von CypA *in vitro* unterschiedliche Effekte (Abb. III.2): Bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (CypA/CA), also der im Virus vorherrschenden Stöchiometrie, wurden längere und weniger miteinander aggregierte Zylinder gebildet. In Anwesenheit höherer CypA Konzentrationen reduzierte sich die Länge und Anzahl der tubulären Strukturen zunehmend. Die Bildung geordneter Multimerisierungsprodukte war bei einem dreifachen molaren Überschuß von CypA vollständig unterdrückt. Es gibt mehrere

Hinweise, daß die *in vitro* beobachteten Effekte spezifisch und das Ergebnis der direkten Bindung von CypA an CA sind: So waren bedeutend höhere CypA-Konzentrationen nötig, um die Aggregationstendenz von Zylindern, die aus CA Varianten mit verminderter CypA Affinität generiert wurden, zu unterdrücken oder deren Verlängerung zu induzieren. Nicht einmal die Zugabe von einem Überschuß an CypA über CA verhinderte die Strukturbildung der veränderten Proteine *in vitro* (Abb. III.2). Der Rückgang in Affinität der verschiedenen CA Proteine für CypA korrelierte also generell mit den beobachteten CypA induzierten Effekten im *in vitro* System. Der relative Anstieg der K_d -Werte war aber nicht quantitativ reflektiert. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf Unterschiede im experimentellen System zurückzuführen, da die K_d -Werte für monomere, an GST gekoppelte Proteine bestimmt wurden, welche zusätzlich auf einem Trägermaterial immobilisiert waren. *In vitro* Assemblierungsreaktionen hingegen wurden in Lösung mit unfusionierten CA Proteinen durchgeführt, die sich dort zu multimeren Komplexen zusammenlagerten.

Für eine direkte Bindung von CypA an die Zylinderoberfläche sprach des weiteren der Vergleich der radialen Dichteverteilung von CA-Röhren, welche in An- oder Abwesenheit von CypA gebildet wurden. Die cryoelektronenmikroskopische Analyse von reinen CA Zylindern zeigte, daß deren Wand aus zwei aufeinanderfolgenden Dichteschichten aufgebaut ist. Sie entsprechen vermutlich den zwei globulären Domänen von HIV-1 CA (Gamble *et al.*, 1997; Gitti *et al.*, 1996). In CypA enthaltenden Zylindern war eine zusätzliche, außen auf der Struktur aufgelagerte Dichte sichtbar (Abb. III.2). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die N-terminale Domäne von CA zur Zylinderaußenseite orientiert ist, da die CypA-Bindungsstelle Teil dieser Region ist. Eine derartige Orientierung von CA innerhalb des viralen Kapsids würde auch mit der Anordnung der Gag-Polypoteine im unreifen Virion übereinstimmen, welche durch die Insertion der N-terminal gekoppelten Myristinsäure in die virale Membran festgelegt ist. Des weiteren wäre durch die Bindung von CypA an der Zylinderoberfläche auch der Befund erklärbar, daß CypA die Aggregation der tubulären Strukturen verhindert. Dies geschieht vermutlich durch eine Abschirmung der für diese Wechselwirkung verantwortlichen CA-Regionen. Auch im Vergleich reifer Viren mit Präparationen viraler Kapside konnte gezeigt werden, daß CypA nur lose mit ihrer Außenseite assoziiert ist (Accola *et al.*, 2000; Welker *et al.*, 2000). CypA geht im Verlauf der Kapsidisolierung selektiv verloren, Bestandteile des Kapsidlumens (Nef, Vpr, IN, RT, PR, NC) werden hingegen in den Kapsidpräparationen angereichert. Von Saphire *et al.* wurde hingegen eine Exposition von CypA auf der Virusoberfläche postuliert (Saphire *et al.*, 1999). Dies war nötig, um die von den Autoren vorgeschlagene CypA-Funktion, die Förderung

der primären Anheftung des Virus an die Zielzelle, zu erklären. Insgesamt spricht die in der vorliegenden Arbeit beobachtete direkte Bindung von CypA an CA *in vitro* gegen die Lokalisierung von CypA auf der Virusoberfläche jedoch für seine Assoziation mit viralen Kapsiden *in vivo*. Um diese Daten zu unterstützen könnte die Lokalisierung von CypA in immunmarkierten Ultradünnschnitten elektronenmikroskopisch überprüft werden. Wilk *et al.* zeigten auf diese Weise die Assoziation des zellulären Proteins Actin mit der NC-Domäne von Gag in unreifen Partikeln (Wilk *et al.*, 1999). Auch der Gehalt von CypA im Virion müßte ausreichend für ein Experiment dieser Art sein, da Actin ebenfalls in einem Verhältnis von 1:10 (Actin/Gag) in das HIV-1 Partikel verpackt wird (Ott *et al.*, 1996; Wilk *et al.*, 1999).

In der *in vitro* Multimerisierungsreaktion stellten sich, abhängig vom CypA zu CA Verhältnis, unterschiedliche Phänotypen ein. Ein Vergleich dieser Effekte ergibt Hinweise auf die verantwortlichen CypA-induzierten Mechanismen. Niedrige Konzentrationen von CypA hatten einen positiven Einfluß auf die Bildung geordneter Strukturen; es entstanden längere, bzw. eine größere Anzahl an Zylindern (im Fall der G89W Variante). Im Gegensatz dazu unterdrückte die Anwesenheit hoher CypA Konzentrationen die Bildung von geordneten Strukturen, oder führte zur Dissoziation präassemblierter Zylinder. Alle drei Beobachtungen könnten durch eine mehr allgemeine „Chaperon“-Funktion von CypA erklärt werden. Neben ihrer PPlase-Aktivität wurde Cyclophilinen bereits früher eine „Chaperon“-Funktion, also die Unterdrückung von Nebenreaktionen bei der Faltung von Proteinen und die Verhinderung der Aggregation falsch gefalteter Proteine, zugeschrieben (Baker *et al.*, 1994; Freeman *et al.*, 1996; Lilie *et al.*, 1993). Eine transiente Wechselwirkung von CypA mit unassemblierten CA Molekülen könnte durch Vermeidung unspezifischer Aggregation in einer kontrollierteren Multimerisierung von CA resultieren. Dies würde die Bildung längerer Röhren ermöglichen. Wenn jedoch alle CA Moleküle mit CypA komplexiert vorlägen, wäre die Zusammenlagerung zu geordneten Strukturen unterdrückt. Es kann davon ausgegangen werden, daß dies in Experimenten, in denen CypA zu CA in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt wurde, tatsächlich der Fall war, da die verwendete CypA Konzentration von 234 μM weit über dem für die CA/CypA-Interaktion bestimmten K_d -Wert liegt (30 μM).

Im Fall präassemblierter Zylinder würde CypA Komplexe mit freien CA Molekülen eingehen und diese dem Multimerisierungsgleichgewicht entziehen, wodurch deren Reassemblierung effektiv verhindert wäre. Ein indirekter Mechanismus dieser Art könnte auch die langsame Kinetik des beobachteten Zylinderabbaus und die dafür benötigten hohen CypA Konzentrationen viel besser erklären als ein direkter

dissoziativer Effekt von CypA (Abb. III.1). Diese Interpretation ist ebenfalls in Einklang mit dem Befund, daß Kapside von Detergens behandelten HIV-1 Partikeln ohne CypA keine höherer Stabilität aufwiesen als Kapside Detergens behandelter wildtyp Viren (Fitzon *et al.*, 2000; Wiegers *et al.*, 1999). Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, daß keines der beschriebenen *in vitro* Systeme die Situation im Virion vollständig reflektiert. Während der viralen Reifung wird CypA weder präassemblierten Strukturen zugeführt, noch entstehen die konusförmigen Kapside *de novo*. Statt dessen resultieren sie aus der Umformung der sphärisch angeordneten Gag Moleküle unreifer Partikel. Allerdings bringt der Prozeß der Reifung eine hoch organisierte strukturelle Umlagerung der in millimolaren Konzentrationen vorliegenden Strukturproteine mit sich. Zur Gewährleistung eines regulierten Ablaufs ist möglicherweise eine „Chaperon“-Funktion, ähnlich der aus den *in vitro* Experimenten abgeleiteten, erforderlich. Ingolf Gross testete den Einfluß von CypA auf die *in vitro* Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2, einem Gag-abgeleiteten Protein mit großer Deletion in MA, welches aber *in vitro* von unreifen Virionen ununterscheidbare Partikel bildet (Gross *et al.*, 2000). Der Befund, daß CypA keinen positiven Effekt auf dessen Assemblierung ausübt (Gross, 1998), weist ebenfalls darauf hin, daß die postulierte „Chaperon“-Funktion erst bei der Selbstassoziation prozessierter CA Moleküle nötig wird.

Der vorgeschlagene positive Effekt von CypA auf die Strukturbildung ist nicht offensichtlich bei der cryoelektronenmikroskopischen Betrachtung von *in vitro* assemblierten CA Zylindern, die in An- oder Abwesenheit von CypA gebildet wurden. Ein Vergleich ihrer Streumuster deutet darauf hin, daß die N- und C-terminalen Domänen von CA in Abwesenheit von CypA gleichermaßen gut geordnet vorliegen, während die nach außen orientierte Domäne weniger geordnet ist, wenn CypA an die Röhren gebunden ist (Abb. III.1). Man könnte diesen Unterschied dadurch erklären, daß durch die stochastische Bindung von CypA an die Röhrenoberfläche an bestimmten Stellen Asymmetrien eingeführt werden. Alternativ könnte die Bindung von CypA tatsächlich Regionen lokaler Unordnung in dem umgebenden regelmäßigen CA Netzwerk induzieren. Die zweite Hypothese wird durch das Ergebnis gestützt, daß bei hohen CypA Konzentrationen keine geordneten Strukturen mehr gefunden werden. Allerdings fällt es schwer, die gestörte lokale Ordnung damit in Einklang zu bringen, daß CypA bei entsprechenden Konzentrationen die Bildung längerer Röhren fördert. Außerdem ist natürlich nicht geklärt, ob CypA einen vergleichbaren Effekt auf reife HIV-1 Kapside im Inneren von Virionen ausübt. Solche subtilen CypA induzierten Einflüsse, falls es sie während der Reifung tatsächlich gibt, wären bei der Auflösung der Ultradünnschnitt-

Elektronenmikroskopie natürlich nicht sichtbar. Kürzlich wurde in unserem und anderen Labors ein Protokoll für die Isolation reifer HIV-1 Kapside von infektiösen Virionen entwickelt (Accola *et al.*, 2000; Kotov *et al.*, 1999; Welker *et al.*, 2000). Dieses System ermöglicht die genauere Untersuchung des Einflusses von CypA auf die Kapsidstruktur.

Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse der *in vitro* Studien dafür, daß CypA die lokale Anordnung der helikal organisierten Kapsidstruktur im Reifungsprozess beeinflußt und möglicherweise seinen Effekt auf die virale Infektiösität durch Bindung an die Außenseite der Kapside ausübt. Wahrscheinlich fördert CypA jedoch nicht die Dissoziation der Kapside, sondern unterstützt deren geordnete Assoziation nach der proteolytischen Spaltung von Gag.

IV.2 HIV-2 CA-NC bildet weder *in vitro* noch innerhalb induzierter Bakterien geordnete Strukturen

Wie bereits erwähnt, assemblierte CA von HIV-2 unter den für HIV-1 CA optimierten *in vitro* Bedingungen nicht zu geordneten tubulären Strukturen (Abb. III.2). Auch die Variation des pH-Werts sowie der Salzkonzentration führt nicht zu einer Erhöhung des Multimerisierungspotentials von HIV-2 CA. CA von RSV ist ebenfalls nicht dazu in der Lage sich *in vitro* zu strukturierten Partikeln zusammenzulagern. Allerdings führte in diesem Fall die C-terminale Verlängerung des Proteins um die nukleinsäurebindende Domäne NC in Anwesenheit von RNA zur Bildung tubulärer Strukturen (Campbell & Vogt, 1995). Ebenso war für das Fusionsprotein CA-NC-SP2 von HIV-1 bekannt, daß dessen Tendenz zur Selbstassoziation im Vergleich zu CA gesteigert ist. In Gegenwart von Nukleinsäuren lagerte sich dieses Protein auch bei niedrigen Proteinkonzentrationen zu hoch geordneten Zylindern zusammen (Gross *et al.*, 1997).

In Anlehnung daran wurde überprüft, ob ein analoges Verhalten auch für die Strukturproteine von HIV-2 zutreffend ist. Jedoch konnte in *in vitro* Multimerisierungsexperimenten von HIV-2 CA-NC nur die Bildung uneinheitlicher Strukturen beobachtet werden, die in ihren Durchmessern sehr variabel waren. Des weiteren wurde neben dem Auftreten dieser zylinder-ähnlichen Partikel auch sphärische Strukturen in den HIV-2 CA-NC Präparationen beobachtet (Abb. III.2). Dies deutet darauf hin, daß in HIV-2 der Übergang zwischen unreifer und reifer Kapsidanordnung möglicherweise nicht so stark reguliert ist verglichen mit HIV-1. CA-NC-SP2 von HIV-1 brachte unter allen getesteten Bedingungen nur tubuläre Strukturen hervor (Gross, 1998). Für die Induktion eines sphärischen Phänotyps war im Fall von HIV-1 die Anwesenheit weiterer N-terminaler Aminosäuren notwendig.

Eines dieser N-terminal verlängerten Proteine, das Protein Δ MA-CA-NC-SP2 war wie HIV-2 CA-NC dazu fähig unter bestimmten Bedingungen (pH 7.0), ein Gemisch an Zylindern (reif) und Sphären (unreif) zu bilden (Gross *et al.*, 2000). Diese wiesen jedoch eine wesentlich höhere Ordnung auf, als dies für die HIV-2 Proteine der Fall war. Allerdings war in der HIV-2 CA-NC Proteinpräparation zusätzlich ein Großteil an verunreinigenden *E.coli* Proteinen enthalten. Insgesamt besteht die Möglichkeit, daß die eingesetzte Menge an CA-NC zu verdünnt war um eine geordnete Assemblierung zu initiieren, das Protein im Verlauf der Reinigung geschädigt worden war, oder aber der Multimerisierungsprozeß durch die Anwesenheit anderer Proteine gestört war. Es ist jedoch gezeigt, daß *E.coli* Proteine prinzipiell die Selbstassoziation Gag-abgeleiteter Proteine nicht stören. Strukturproteine verschiedener Retroviren bilden nach ihrer Induktion innerhalb der Bakterienzellen Partikel, welche meist ihren *in vitro* Assemblierungsprodukten ähneln (Campbell & Vogt, 1997; Gross *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 2000; Klikova *et al.*, 1995; Rumlova-Klikova *et al.*, 2000). In diesem „*in vivo*“ System konnte auch die Zylinderbildung von HIV-1 CA und CA-NC-SP2 nachgewiesen werden (Gross, 1998; Gross *et al.*, 1998). Im Fall des Mason-Pfizer Affenvirus (M-PMV) wurde von Klikova *et al.* gezeigt, daß sich in *E.coli*-Zellen CA alleine nicht zu Strukturen zusammenlagert, wohl aber in Fusion mit dem daran angrenzenden NC Protein (Rumlova-Klikova *et al.*, 2000). Allerdings konnten nach Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie im Fall von HIV-2, auch in diesem „*in vivo*“ System, weder für CA noch für CA-NC geordneten Strukturen entdeckt werden (Abb. III.1). Es bleibt jedoch zu bedenken, daß möglicherweise die Expression der HIV-2 Proteine für eine effektive Multimerisierung nicht stark genug war. Bisher ist nicht analysiert worden, ob für die Assemblierung von retroviralen Strukturproteinen in Bakterienzellen ein kritischer Schwellenwert ihrer Konzentration erreicht werden muß.

Neben ihrer exakten Aminosäurezusammensetzung unterscheiden sich die homologen CA-NC-Proteine von HIV-1 und -2 auch durch das Fehlen der SP2-Domäne im Fall des HIV-2 Proteins. Im Kontext von HIV-1 konnte SP2 jedoch keine Funktion für die Assemblierung *in vitro* zugeschrieben werden (Gross *et al.*, 2000).

Das Protein CA-NC von HIV-2 bildet also, im Gegensatz zu dem ihm homologen Protein von HIV-1, weder *in vitro* noch im Inneren induzierter Bakterien geordnete Partikel.

IV.3 Kleine pH-abhängige Konformationsänderungen von Δ MA-CA-NC-SP2 korrelieren mit den zwei Assemblierungsphänotypen des Proteins

Vier zusätzliche Aminosäuren am N-terminalen Ende von CA sind ausreichend, um den *in vitro* Assemblierungsphänotyp von zylindrischen Partikeln (entsprechen der Anordnung im reifen Virus) zu sphärischen (entsprechen der Anordnung im unreifen Virion) zu verändern (von Schwedler *et al.*, 1998). Die meisten N-terminal verlängerten Versionen von CA bildeten jedoch in *in vitro* Systemen sphärische Strukturen sehr heterogener Größen (Campbell & Rein, 1999; Gross *et al.*, 1998; von Schwedler *et al.*, 1998), wodurch der direkte Vergleich zu den insgesamt größeren, unreifen HIV-1 Virionen schwer fiel. Erst die Fusion eines Matrix-abgeleiteten Proteins, welches eine große Deletion der Aminosäuren 16 bis 99 enthält sowie die gleichzeitige C-terminale Verlängerung um die an CA angrenzenden Domänen SP1, NC und SP2, führte zur Bildung sphärischer Partikel identischer Form, Größe und innerer Organisation verglichen mit unreifen Virionen (Gross *et al.*, 2000). Interessanterweise konnte *in vitro*, allein durch Veränderung der pH-Bedingungen von pH 8 auf pH 6, die Zusammenlagerung des gleichen Proteins auch zu tubulären und konischen Strukturen induziert werden. Bisher ist davon ausgegangen worden, daß jegliche N-terminale Verlängerung von HIV-1 CA die Bildung von Zylindern unterdrücken würde. Diese Annahme entstand aus der Beobachtung, daß Pro1 von CA mit Asp51 unter Bildung einer β -Haarnadelschleife eine Salzbrücke eingeht (Gitti *et al.*, 1996). Die Rückfaltung der 13 N-terminalen Aminosäuren in die β -Haarnadelschleife, sowie deren Stabilisierung sind jedoch nur nach proteolytischer Prozessierung des CA N-Terminus möglich. Es wäre denkbar, daß durch die Umlagerung des N-Terminus eine neue CA/CA-Kontaktfläche kreiert wird, die für die Stabilisierung der Zylinder nötig ist. Nach diesem Modell käme die proteolytische Spaltung von CA einem für die Bildung von Zylindern (*in vitro*) oder reifen HIV-1 Kapsiden (*in vivo*) nötigem konformationellen Schalter gleich.

Die Tatsache, daß sich Δ MA-CA-NC-SP2 *in vitro* in Abhängigkeit des pH-Werts zu Partikeln unterschiedlicher Morphologie zusammenlagert, spricht für eine zugrunde liegende pH-abhängige Konformationsänderung des Proteins. Dies konnte unter Verwendung monoklonaler Antikörper (mAbs) bestätigt werden. Antikörper, die an Helix 3 (Aminosäuren 49-61), bzw. Helix 6 (Aminosäuren 109-120) der N-terminalen Domäne von CA binden, hatten eine wesentlich höhere Affinität für ihre Epitope bei pH 8 als bei pH 6 (Gross *et al.*, 2000). Die Antikörper zeigten also bei den gleichen pH-Werten unterschiedliche Bindungsaffinitäten, die auch die Bildung morphologisch

unterschiedlicher Partikel induzieren. Der konformationelle Übergang konnte durch die Antikörperbindungsstudien auf einen Bereich zwischen pH 6.8 und pH 7.2 eingegrenzt werden. Von der Konformationsänderung können entweder die Epitope selbst betroffen sein, oder aber sie verlieren durch die Verschiebung benachbarter struktureller Elemente ihre Zugänglichkeit. Das Ausmaß der Konformationsänderung wurde durch die Analyse von Fern-UV-CD-Spektren abgeschätzt: Ein Vergleich der pH 8 Konformation mit der bei pH 6 zeigt nur eine geringe Verminderung α -helikaler Beiträge (Abb. III.1). Daher kann davon ausgegangen werden, daß der morphologische Schalter nicht in großen Strukturveränderungen von Sekundärstrukturelementen, sondern eher in lokalen Auflockerungen oder minimalen Entfaltungen α -helikaler Bereiche begründet liegt. Etwas größere pH-induzierte Unterschiede wurden in der Tertiärstruktur von Δ MA-CA-NC-SP2 beobachtet. In Korrelation zu den Antikörperbindungsstudien nahm die Intensität des Fluoreszenzsignals besonders in dem Bereich zwischen pH 6.8 und pH 7.4 ab (Abb. III.3). Auch diese Beobachtung wäre durch eine zunehmende Auflockerung der Struktur zu erklären. Auf Grund dessen lägen Aminosäurereste aus hydrophober Umgebung nun lösungsmittel exponiert vor, wodurch ihre Fluoreszenzintensität abgeschwächt würde.

Ein weiteres Indiz für die Beteiligung der N-terminalen, α -helikalen CA Bereiche in die Konformationsänderung lieferte die kürzlich gelöste NMR-Struktur der am N-Terminus um vier Aminosäuren verlängerten, N-terminalen Domäne von CA. Interessanterweise waren bei diesem Protein neben der fehlenden Salzbrücke zwischen Pro1 und Asp51 signifikante Unterschiede in den Positionen von Helix 1 und Helix 6 im Vergleich zur prozessierten Form der Domäne zu erkennen (Sundquist, W., persönliche Mitteilung), (Gitti *et al.*, 1996). Den zwei Assemblierungsphänotypen können also strukturelle Unterschiede zugeordnet werden, die in unterschiedlichen Interaktionsoberflächen des Proteins resultieren. Der konformationelle Übergang kann *in vitro* durch Veränderung des pH-Werts ausgelöst werden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die Reifung von HIV-1 *in vivo* tatsächlich durch Variation des pH-Werts reguliert wird, da HIV, ohne Umwege über acifizierende Zellkompartimente, durch die Knospung direkt aus dem zellulären Lumen hervorgeht. Möglicherweise sind die pH-induzierten und die durch die proteolytische Spaltung zwischen einzelnen Gag-Domänen eingeleiteten Veränderungen in inter- und intramolekularen Wechselwirkungen einander ähnlich. Da der konformationelle Übergang bei einem pH-Wert von ungefähr 7 stattfindet, liegen beide Konformere bei physiologischen Bedingungen vermutlich im Gleichgewicht vor. Es sind also prinzipiell beide Konformationen, die zu

unterschiedlichen Multimerisierungsformen führen, möglich. Durch die proteolytische Spaltung des N-Terminus von CA wird dann das Gleichgewicht zu der Konformation, welche die Bildung reifer Kapside unterstützt, verschoben.

IV.4 Das Verdünnungs-System für die Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2 ermöglicht die zeitliche Verfolgung der Reaktion

Die spektralen Eigenschaften eines Proteins werden nicht nur durch dessen Konformationsänderungen beeinflusst, sondern auch durch Protein-Ligand- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen (Lakowicz, 1983). Daher wurde für das Protein Δ MA-CA-NC-SP2 geprüft, ob neben den für die verschiedenen Assemblierungsphänotypen verantwortlichen Konformationsänderungen des gelösten Proteins auch Unterschiede zwischen gelöster und multimerisierter Form von Δ MA-CA-NC-SP2 detektierbar sind. Die dynamische Lichtstreuung (DLS) dient zur Bestimmung der Größe von Makromolekülen, ein Parameter der sich im Verlauf der Selbstassoziation stark verändern sollte. Sie ließ sich jedoch nicht als Methode zur Differenzierung der beiden Zustände einsetzen. Analyse der Daten ergab, daß bei den für die Messung der DLS benötigten hohen Proteinkonzentrationen Δ MA-CA-NC-SP2 selbst unter dissoziativen Bedingungen nicht als Monomer vorliegt. Je größer die Proteinkonzentration, um so mehr nahm auch die Größe der Proteinassoziate zu (Tab. III.1). Auf Grund dieser graduellen Veränderung war eine saubere Trennung zwischen unassemblierten und assemblierten Spezies nicht möglich. Daher wurde die Anwendung dieser Methode nicht weiter verfolgt.

In einem zweiten Ansatz wurde versucht die geordnete Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2 zu sphärischen Partikeln mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie zu dokumentieren. Für die Bildung sphärischer Δ MA-CA-NC-SP2-Assoziate ist aber nicht nur durch die Zugabe von Nukleinsäuren, sondern auch die Verschiebung des pH-Werts von pH 6 auf pH 8 nötig. Auf Grund der pH-abhängigen Fluoreszenzeigenschaften von Δ MA-CA-NC-SP2 (siehe oben) konnten die beiden Zustände nicht einfach durch direkten Vergleich ihrer intrinsischen Fluoreszenz unterschieden werden (Abb. III.1). Es mußte ein pH-unabhängiges Verfahren entwickelt werden, welches die Multimerisierung virusähnlicher Partikel erlaubt.

Kontrolliert durch die Elektronenmikroskopie wurden die Bedingungen für die Verdünnung hochkonzentrierter Δ MA-CA-NC-SP2-Lösungen in nukleinsäurehaltige Puffer derart optimiert, daß die Effizienz der Partikelbildung mit der der Dialyse-

induzierten Multimerisierung vergleichbar war. Bei pH-Werten von 6.0 bis 7.6 und NaCl-Konzentrationen zwischen 150 mM und 220 mM bildeten sich Partikel, die in ihrer Morphologie etwas stärker variierten, als dies für die sphärischen Δ MA-CA-NC-SP2-Partikel der Fall ist, aber in ihrer Größe und Wandstärke vergleichbar waren (Abb. III.2). Daher kann davon ausgegangen werden, daß die Art der Wechselwirkung in beiden Systemen gleich ist. Die Verdünnung von HIV-1 CANC führte unter den gleichen Bedingungen ebenfalls zu dessen Multimerisierung. Es entstanden Zylinder, die sich von Dialyse-induzierten Röhren nicht unterschieden. Damit wurde ein pH-unabhängiges System etabliert, in welchem die Selbstassoziation Gag-abgeleiteter Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt gestartet werden kann. Voraussetzung ist, daß die Proteine die nukleinsäurebindende Domäne NC enthalten. Mit einer geeigneten Methode kann damit der zeitliche Verlauf einer Multimerisierungsreaktion verfolgt werden. Erste Versuche die Fluoreszenzspektroskopie zu diesem Zweck einzusetzen, ergaben einen exponentiellen Reaktionsverlauf mit einer Halbwertszeit von 6.3 min (Abb. III.1). Allerdings sollte das Experiment in Abwesenheit von Nukleinsäuren wiederholt werden, um die Spezifität der Fluoreszenzsignalveränderung für die Multimerisierung zu überprüfen. Bisher kann nicht ganz ausgeschlossen werden, daß der beobachtete Intensitätsrückgang zum Teil auch auf eine pH-induzierte Konformationsänderung des Proteins zurückzuführen ist. Insgesamt erscheint der beobachtete Zeitrahmen jedoch für die Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2 plausibel, da auch in der mittels Dialyse eingeleiteten Assemblierungsreaktion bereits nach 15 min Partikel sichtbar waren (Gross, 1998). Neben der gezielten kinetischen Charakterisierung der Multimerisierungsreaktion könnte dieses System auch für die Entwicklung und Optimierung kleinmolekularer, gegen die Assemblierung gerichteter Inhibitoren eingesetzt werden.

IV.5 Δ MA-CA-NC-SP2 bindet wie NC spezifisch an das RNA-SL3, zeigt jedoch verminderte Affinität gegenüber Nukleinsäuren mit mehr als einer Bindungsstelle

Das HIV Protein Nukleokapsid (NC) erfüllt sowohl als Domäne des Gag-Polypeptids als auch in seiner vollständig gereiften Form während des viralen Replikationszyklus eine Vielzahl von Aufgaben. Allen ist die Interaktion mit Nukleinsäuren gemein. Nach der Synthese viraler Proteine in der infizierten Zelle ist NC als Teil von Gag für die Selektion der genomischen RNA aus dem Pool zellulärer Nukleinsäuren verantwortlich. Gag wird auf Grund seiner N-terminalen Myristinylierung an die

Plasmamembran geleitet, wo die Zusammenlagerung zu Viruspartikeln beginnt. Nach dem Austritt unreifer Virionen aus der Zelle führt die proteolytische Spaltung des Gag-Polypeptids zur Freisetzung der NC-Domäne, welche dann die Kondensation zum Ribonukleokapsidkomplex initiiert. Diese stabilste Struktur des reifen viralen Partikels (Davis & Rueckert, 1972; Payer *et al.*, 1994) enthält ein Dimer der genomischen RNA, ca. 2000 Moleküle NC, die mit dem RNA-Dimer über die gesamte Länge eng verbunden sind, einige Moleküle der reversen Transkriptase (RT) und Integrase (IN), sowie einige zelluläre und gespleißte virale RNAs (Dickson *et al.*, 1985). Bildung dieses kondensierten RNA/NC-Komplexes stabilisiert das virale Genom (Feng *et al.*, 1996b) und schützt es vor Abbau durch RNAsen (Tanchou *et al.*, 1995). Neben der spezifischen Verpackung des viralen Genoms und dessen Kondensation in den Nukleokapsidkomplex, erfüllt NC in seiner Funktion als Nukleinsäure-„Chaperon“ weitere Aufgaben (Rein *et al.*, 1998). Diese, wie z.B. die Dimerisierung der viralen RNA, die Anlagerung der tRNA₃^{Lys}, die Stimulierung von Strang-Transfer-Ereignissen bei der reversen Transkription sowie die Unterstützung der Integration der viralen RNA in das Genom der Zelle, können bestimmten Phasen des viralen Replikationszyklus zugeordnet werden (siehe I.4). Bisher ist nicht geklärt, wie ein geordneter Ablauf aller NC-assoziiierter Aktivitäten gewährleistet wird. Einige sind wahrscheinlich durch die Bereitstellung und lokale Verfügbarkeit der einzelnen Reaktionspartner reguliert, andere möglicherweise durch die Abspaltung der NC-Domäne von Gag. So scheint *in vivo* erst die proteolytische Prozessierung von NC, die vollständige Dimerisierung der viralen RNA auszulösen (Fu *et al.*, 1994; Fu & Rein, 1993; Stewart *et al.*, 1990). Ebenso scheinen in der unspezifischen Assoziation mit genomischer RNA Unterschiede zwischen Gag und NC zu bestehen. Diese Beobachtung machten (Stewart *et al.*, 1990), als sie die UV-Quervernetzungsprodukte eines Protease defizienten Retrovirus mit denen eines reifen Virus verglichen. Das vollständig prozessierte NC ließ sich ca. 1000 mal effizienter mit der viralen RNA verknüpfen als das Gag-Polypeptid.

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob sich auch die Nukleinsäurebindungseigenschaften der NC-Domäne *in vitro* im Verlauf der Prozessierung von Gag verändern, um so den unterschiedlichen Anforderungen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Replikationszyklus besser gerecht werden zu können.

Dazu wurden in Titrationsexperimenten zunächst die Affinitäten von vier Gag-abgeleiteten Proteinen zu einem kurzen DNA-Oligonukleotid mit zufälliger Sequenz in Anwesenheit von 100 mM und 180 mM NaCl bestimmt. Erwartungsgemäß bildete das 6mer auf Grund der Übereinstimmung mit der für NC determinierten Bindungsstellengröße mit allen Proteinen Komplexe mit 1:1-Stöchiometrie aus (Abb.

III.2). Die für NC in Gegenwart von 100 mM NaCl bestimmte Dissoziationskonstante (K_d) von 124 nM liegt im Rahmen der in der Literatur dokumentierten Werte (Tab. III.1). Insgesamt existiert eine Vielzahl von *in vitro* Untersuchungen, welche die Nukleinsäurebindungseigenschaften von NC beleuchten. Unterschiedliche Versuchsbedingungen (Pufferzusammensetzung: pH, Salzkonzentration, Temperatur, etc.) erschweren die direkte Gegenüberstellung dieser Daten. Daher wird im Folgenden nur auf Daten näher eingegangen die in Gegenwart von 100 mM NaCl erhoben wurden, entsprechend einiger in dieser Arbeit durchgeführten Messungen. Khan *et al.* verfolgten das Nah-UV-CD Signal von PolyA (RNA) bei 264 nm in Abhängigkeit der NC-Zugabe (Khan & Giedroc, 1992). Der aus dieser unspezifischen Interaktion ermittelte K_d -Wert betrug 33 nM. Für andere unspezifische Interaktionen von NC mit langen RNA-Elementen wurden Dissoziationskonstanten von 833 nM (tRNAPhe) und 1250 nM (5S RNA) bestimmt (Mely *et al.*, 1995). Systematische Analysen mit kurzen Oligonukleotiden, welche daher mit denen dieser Arbeit besser vergleichbar sind, haben Vuilleumier *et al.* durchgeführt (Vuilleumier *et al.*, 1999). Sie bestimmten mit Hilfe von Tryptophanfluoreszenz-Messungen K_d -Werte zwischen 143 μ M (d(AAAAAA)) und 141 nM (d(TGTGCC)) je nach Sequenz der als Ligand eingesetzten DNA-6mere. Diese Daten verdeutlichen den großen Spielraum (drei Größenordnungen) der Affinitäten von NC gegenüber kurzen Oligonukleotiden. Ein Vergleich der identischen 6mere auf DNA- oder RNA-Ebene ergab ähnliche K_d -Werte, ungeachtet des Nukleinsäuretyps. Das hier verwendete DNA-6mer mit der Sequenz d(GGCTAG) stellt also einen Liganden hoher Affinität für Gag-abgeleitete Proteine dar. Fischer *et al.* zeigten in Bindungsexperimenten unter der Verwendung von kurzen Homopolymeren (8mere), daß NC bevorzugt Komplexe mit d(G)₈ oder r(G)₈ eingeht (Fisher *et al.*, 1998). Die stabilste Bindung aber erzielten sie mit der alternierenden Sequenz d(TG)₄ oder r(UG)₄. Auch bei Vuilleumier *et al.* enthält der Ligand mit der höchsten Affinität für NC eine Abfolge alternierender T und G Basen (siehe oben) (Vuilleumier *et al.*, 1999). Vermutlich begünstigt der hohe G-Anteil des in der vorliegenden Arbeit verwendeten 6mers die Interaktion, zumal in NMR-Studien von NC/Nukleinsäurekomplexen die intensive hydrophobe Wechselwirkung (stacking von Trp37 mit G) exponierter Guanosine mit den Zn-Fingern nachgewiesen wurde (Amarasinghe *et al.*, 2000; De Guzman *et al.*, 1998; Morellet *et al.*, 1998).

Insgesamt unterschieden sich die einzelnen hier getesteten Proteine kaum in ihren, mittels genau quantifizierbarer Titrations determinierten, Affinitäten gegenüber dem 6mer mit unspezifischer Sequenz (Tab. III.1). Filterbindungsstudien zufolge konnten

auch bisher keine Abweichungen in den Bindungsaffinitäten zwischen Gag und NC detektiert werden (Clever *et al.*, 1995; Clever *et al.*, 2000; Lochrie *et al.*, 1997). Allerdings wurden in diesen Arbeiten GST-gekoppelte HIV-Proteine auf ihre Interaktion mit RNA-Elementen untersucht, welche aus dem Verpackungssignal abgeleitet waren. Eine N-terminale Verlängerung von NC durch das Anhängen von GST könnte seine Eigenschaften im Vergleich mit vollständig prozessiertem NC verändern. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zeigen daher zum erstenmal, daß sich die Affinitäten von NC und dem Gag-ähnlichen Protein Δ MA-CA-NC-SP2 gegenüber DNA-Oligonukleotiden mit einer Länge von 6 Basen *in vitro* nicht unterscheiden.

Bestimmung der Dissoziationskonstanten zweier Bindungspartner bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen gibt Aufschluß über den Einfluß von Ionen auf diese Interaktion (Record *et al.*, 1976). Trägt man den Logarithmus der K_d -Werte gegen den Logarithmus an Na^+ -Ionen auf, erhält man für Protein-Nukleinsäure-Interaktionen über einen bestimmten Bereich eine lineare Abhängigkeit, dessen Steigung ein Maß für die Salzabhängigkeit der betreffenden Komplexbildung darstellt. Daraus kann wiederum die Anzahl der durch die Bindung entstandenen Ionenpaare abgeleitet werden (Record *et al.*, 1976). Bei einer solchen doppeltlogarithmischen Auftragung fallen die hier für die Proteine NC und Δ MA-CA-NC-SP2 bestimmten Werte auf eine Gerade mit einer Steigung von -2.5 ± 0.4 (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht der Bildung von 3.5 ± 0.5 Ionenpaaren (Mely *et al.*, 1995; Record *et al.*, 1976). Eine etwas stärkere Salzabhängigkeit bestimmten Kahn *et al.* (Khan & Giedroc, 1992), Mely *et al.* (Mely *et al.*, 1995) und Urbaneja *et al.* (Urbaneja *et al.*, 1999) für NC von HIV-1, sowie Urbaneja *et al.* (Urbaneja *et al.*, 2000) für SIV NC, allerdings für die Interaktion mit Oligonukleotiden > 10 Basen. Daraus schlossen sie, daß mit längeren Oligonukleotiden vier Ionenpaare gebildet werden, zwei davon mit dem ersten Zn-Finger, eines mit dem zweiten Zn-Finger und das letzte mit der N-terminalen Region von NC (Urbaneja *et al.*, 1999). Vermutlich werden also in Komplexen mit kurzkettigen Nukleotiden nur die drei von den Zn-Fingern ausgehenden Ionenbindungen eingegangen. Auch Vuilleumier *et al.* konnten keine zusätzliche Stabilisierung in der Interaktion mit Nukleotiden < 10 Basen durch die Anwesenheit der an die Zn-Finger angrenzenden Domänen feststellen (Vuilleumier *et al.*, 1999). Sie verglichen das Protein NC-SP2 mit einer verkürzten Form von NC, der die ersten 11 N-terminalen Aminosäuren fehlten ((12-53)NC). Damit sind also auch hydrophobe Wechselwirkungen N- und C-terminaler Bereiche in dieser Art der Interaktion zu vernachlässigen. Insgesamt sind daher, in Einklang mit Ergebnissen der vorgelegten Arbeit, keine Unterschiede in den

Bindungsaffinitäten unterschiedlich langer NC-enhaltender Proteine gegenüber kurzen Oligonukleotiden zu erwarten, solange beide Zn-Finger vollständig vorhanden sind.

Da die Gag-abgeleiteten Proteine Δ MA-CA-NC-SP2 und NC keine Unterschiede in ihrer Interaktion mit den aus 6 Basen bestehenden Liganden unspezifischer Sequenz aufwiesen, wurde getestet, wie sich die Proteine gegenüber spezifischen Nukleinsäuren verhalten. Als Ligand wurde das Haarnadelstrukturelement SL3 des HIV-1 Verpackungssignals (ψ) gewählt. SL3 hat unter den vier Schleifenstrukturen des Verpackungssignals die am stärksten konservierte Sequenz (Hayashi *et al.*, 1993) und ist alleine ausreichend, um die Verpackung heterologer RNAs in Virus-ähnliche Partikel zu steuern (Hayashi *et al.*, 1992). Die Spezifität der Interaktion wurde des weiteren durch die hoch aufgelöste NMR-Struktur des NC/SL3-Komplexes verifiziert (De Guzman *et al.*, 1998). Die Dissoziationskonstanten der Komplexe Gag-abgeleiteter Proteine mit SL3 Sequenzen wurden in Gegenwart von 180 mM NaCl bestimmt (Tab. III.1). Messungen bei niedrigeren Salzkonzentrationen wären in unserem System auf Grund der extrem hohen Affinitäten nicht verlässlich bestimmbar gewesen. Es wurde sowohl das RNA-SL3, als auch sein DNA-Analogon eingesetzt.

Das prozessierte NC zeigte eine etwa 5fach erhöhte Affinität (96 nM) gegenüber dem DNA-Analogon des SL3 (dSL3-WT) verglichen mit der unspezifischen 6mer Interaktion. Im Gegensatz dazu zeigte das nahezu vollständige Gag-Protein Δ MA-CA-NC-SP2 mit einem K_d -Wert von 421 nM keine Veränderung gegenüber der in der 6mer-Titration bestimmten Größenordnung. Vuilleumier *et al.* konnten mit dem verkürzten NC ((12-53)NC) keine Affinitätssteigerung gegenüber dem dSL3-WT verzeichnen, wohl aber mit dem Protein NC-SP2 (Vuilleumier *et al.*, 1999). Vermutlich tragen also bei dieser Interaktion N- und C-terminale Bereiche zur Stabilisierung bei, wobei diese zusätzliche Stabilisierung im Protein Δ MA-CA-NC-SP2 gestört zu sein scheint. Die Komplexbildung der Proteine mit dem wildtyp RNA-SL3 (rSL3-WT) führte sowohl bei NC, als auch bei Δ MA-CA-NC-SP2 zu einer ca. 10fach festeren Bindung verglichen mit dem DNA-Analogon von SL3 (Abb. III.2). Dieser Befund war überraschend, da bisher in *in vitro* Studien kein Unterschied zwischen DNA- oder RNA-Liganden festgestellt worden war (Fisher *et al.*, 1998; Urbaneja *et al.*, 2000; Vuilleumier *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Experimenten setzten diese Autoren keine spezifischen Haarnadelstrukturen als Liganden ein, sondern lediglich kurze, unstrukturierte Oligonukleotide. Damit wurde in der vorliegenden Arbeit zum erstenmal gezeigt, daß

NC-Proteine eine höhere Affinität gegenüber strukturierter RNA, als gegenüber analogen DNA-Sequenzen aufweisen. Dies liegt möglicherweise in der spezifischen Struktur doppelsträngiger RNAs begründet und käme daher bei kurzen Oligonukleotiden ohne doppelsträngige Bereiche nicht zum tragen. Doppelsträngige RNAs nehmen im Vergleich zur Watson-Crick B-Helix (DNA) die Konformation einer A-Helix ein (Stryer, 1987).

Wurden alle Nukleotide der Bindungsschleife gegen Adenosine ausgetauscht, also eine intensive hydrophobe Wechselwirkung von Trp37 verhindert, nahm die Affinität im Fall von Δ MA-CA-NC-SP2 um das zweifache und von NC um knapp zwei Größenordnungen ab. Basierend auf den K_d -Wert-Bestimmungen mit 6meren ist ein Affinitätsunterschied von 2 Größenordnungen zwischen nur aus Adenosin bestehenden, oder aber Guanosin-enthaltenden Sequenzen durchaus zu erwarten (Vuilleumier *et al.*, 1999). Die Daten dieser Arbeit deuten daher darauf hin, daß das Gag-ähnliche Protein Δ MA-CA-NC-SP2 bevorzugt Bindungen mit strukturierten Ribonukleinsäuren eingeht, NC hingegen eine größere Sequenzabhängigkeit in seinem Bindeverhalten aufweist, dafür aber nicht so stark zwischen der Art der Nukleinsäure zu differenzieren scheint.

Insgesamt bindet NC jedoch verglichen mit Δ MA-CA-NC-SP2 etwas fester an spezifische Nukleinsäuren. Die NMR-Struktur des SL3/NC-Komplexes hat gezeigt, daß das N-terminale Ende von NC die Konformation einer 3_{10} -Helix annimmt, die wiederum mit dem ersten Zn-Finger in Wechselwirkung tritt und beide Strukturelemente gemeinsam an die große Furche des RNA-Stamms binden (De Guzman *et al.*, 1998). Durch eine N-terminale Verlängerung von NC könnte a) die Ausbildung der 3_{10} -Helix gestört sein, b) die Interaktion der 3_{10} -Helix mit dem ersten Zn-Finger abgeschwächt sein, oder c) die beiden Strukturelemente sterisch nicht mehr so gut in die große Furche des SL3-Stamms passen. Möglicherweise beeinflusst eine Kombination dieser Effekte die optimale Wechselwirkung von Δ MA-CA-NC-SP2 mit SL3, was sich in etwas höheren K_d -Werten bemerkbar macht. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Salzabhängigkeit beider Proteine mit dem SL3-Liganden zu bestimmen. Damit könnte geprüft werden, ob auch Δ MA-CA-NC-SP2 trotz seiner N-terminalen Verlängerung dazu in der Lage ist, die in NC von der 3_{10} -Helix ausgehende Salzbrücke mit dem SL3-Stamm zu bilden.

Für die Proteine Δ MA-CA-NC-SP2 und NC war nun gezeigt, daß sie sich gegenüber kurzen Oligonukleotiden (6mer) mit zufälliger Sequenz gleich verhalten, beide an strukturierte RNA insgesamt fester binden, als an analoge DNA-Sequenzen, jedoch Δ MA-CA-NC-SP2 im Gegensatz zu NC seine Affinität nur gegenüber dem RNA-SL3

spezifisch steigert, nicht jedoch gegenüber dem DNA-Analogon. Im Anschluß daran wurde geprüft, ob sich die Proteine in ihrer Interaktion mit Oligonukleotiden, welche die Bindung von mehr als nur einem Proteinmolekül erlauben, unterscheiden. Dies ist von Interesse, da *in vivo* nur vollständig prozessiertes NC dazu in der Lage ist, mit der genomischen RNA über eine unspezifische Interaktion so in Verbindung zu treten, daß sie vor Nukleasen geschützt ist.

In FRET-Titrationsen eines 16 Basen langen, dansylierten Oligodesoxynukleotids (DN16) mit Proteinen unterschiedlicher Länge, zeigte Δ MA-CA-NC-SP2 einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Dieser wurde als sequentielle Bindung zweier Proteinmoleküle interpretiert (Abb. III.4). Auf Grund der Länge des Oligonukleotids wurde auch bei den kürzeren Proteinen CA-NC-SP2 und NC-SP2 von zwei Bindungsereignissen ausgegangen. Anpassung der Daten mit einem dementsprechenden Bindungsmodell ergab ähnliche Dissoziationskonstanten für die erste Bindung, jedoch größere Unterschiede in der zweiten Interaktion (Tab. III.1). Insgesamt stimmen die K_d -Werte der ersten Bindung mit den in den Tryptophanfluoreszenz-Messungen bestimmten Werten für die Interaktion mit kurzen Oligonukleotiden im Rahmen der Meßgenauigkeit gut überein. Bei der vergleichenden Bewertung darf nicht außer Acht gelassen werden, daß die durch Anwendung eines globalen Fit Algorithmus abgeleiteten Werte, nicht zuletzt wegen der weniger stringenten Definierbarkeit des Bindungsmodells, einem größeren Fehler unterliegen (Thomä, N. persönliche Mitteilung).

In Übereinstimmung mit bisherigen Befunden konnte für das Protein NC-SP2 keine Kooperativität in seinem Bindungsverhalten nachgewiesen werden (Khan & Giedroc, 1994; Mely *et al.*, 1995; Urbaneja *et al.*, 2000). N-terminale Verlängerung von NC-SP2 führte jedoch zu einer graduellen Inhibierung der zweiten Bindung, was sich in deren hohen K_d -Werten widerspiegelt. Eine denkbare Erklärung dieser negativen Kooperativität wäre, daß die verlängerten Proteine auf Grund anderer sterischer Gegebenheiten größere Nukleinsäurebindungsstellen benötigen und daher die zweite Bindung durch die Kürze des angebotenen Oligonukleotids gestört ist. Bei der Verwendung von Oligonukleotiden mit vier zusätzlichen Basen konnte keine Änderung des Bindungsverhaltens festgestellt werden. Trotzdem wäre es von Interesse unter Verwendung langer Nukleinsäuren die Bindungsstellengrößen der einzelnen Proteine vergleichend zu bestimmen (Bombarda *et al.*, 1999; Khan & Giedroc, 1994; Mely *et al.*, 1995; You & McHenry, 1993). Besonders deutlich wird die Reduktion der Affinität von N-terminal verlängerten Proteinen gegenüber unspezifischen Nukleinsäuren mit zwei Bindestellen in der direkten Gegenüberstellung aller vier Gag-abgeleiteter Proteine (Abb. III.3). In welchen

molekularen Mechanismen dieser Effekt begründet liegt, konnte nicht geklärt werden. Der graduelle Verlust in Affinität abhängig von der Länge des Proteins, der nicht gegenüber Nukleinsäuren mit nur einer Bindungsstelle beobachtet wurde, spricht jedoch gegen einen streng regulierten Vorgang welcher durch gezielte Mutationsstudien geklärt werden könnte. Vermutlich spielen die Einschränkung in Flexibilität N-terminaler NC-Bereiche (3₁₀-Helix) sowie sterische Behinderung auf Grund der Molekülgrößen eine Rolle.

Im Rahmen dieser Gegebenheiten konnte eine gute Übereinstimmung mit dem mittels ITC determinierte K_d -Wert für die NC/6mer Interaktion festgestellt werden. Dieser ist um den Faktor zwei größer als der in Tryptophanfluoreszenz-Messungen bestimmte Wert (Abb. III.1). Eine Fehlerquelle bei der Anpassung der ITC-Daten, welche die Tendenz zu größeren Werten erklären könnte, ist die insgesamt kleine Enthalpieänderung (ΔH) der Interaktion, die in einer geringen Wärmeleistung, also in einem kleinen Primärsignal resultiert. Leider konnte auch bei der Durchführung der Messung bei einer anderen Temperatur (30°C) das Primärsignal nicht vergrößert werden (Daten nicht gezeigt). Weiterführend könnten auch für einen direkten Vergleich die Dissoziationskonstante von Δ MA-CA-NC-SP2 zu dem 6mer mittels ITC bestimmt werden. Interessant wäre es auch für beide Proteine die Bindung an das 16mer vergleichend zu charakterisieren. Um eine Übertitration zu vermeiden, wäre es vermutlich sinnvoller als Titranten das Protein einzusetzen und das 16mer vorzulegen.

Insgesamt sind K_d -Werte von ca. 44 nM für Δ MA-CA-NC-SP2, oder < 5 nM für NC für spezifische RNA-Protein Interaktionen typisch. Sie liegen in der gleichen Größenordnung, wie sie auch für Rev (1-3 nM) (Daly *et al.*, 1989; Heaphy *et al.*, 1990) und Tat (10 nM) (Dingwall *et al.*, 1990; Slice *et al.*, 1992) beobachtet wurden. Allerdings erscheint zunächst ein Affinitätsunterschied von Faktor 10 zu gering, um zwischen der spezifischen Proteinbindungsstelle und unspezifischen Nukleinsäuresequenzen differenzieren zu können. Ein ähnliches Bild ergibt sich jedoch bei der Betrachtung anderer RNA bindender Proteine. Das HIV Protein Rev zeigt einen 20fachen Unterschied in seiner Affinität für sense und antisense RRE-Sequenzen (Daly *et al.*, 1989; Heaphy *et al.*, 1990). Bei dem HIV Protein Tat, oder dem ribosomalen *E.coli* Protein S4 ist die Affinität gegenüber unspezifischen Sequenzen um das 10- (Dingwall *et al.*, 1990) bzw. 5fache verringert (Heaphy *et al.*, 1990; Vartikar & Draper, 1989). Unter starkem kompetitivem Druck konnte jedoch für die Rev-RRE-Interaktion gezeigt werden, daß sie wesentlich stärker ist als die Komplexbildung zwischen Rev und unspezifischen RNAs (Daly *et al.*, 1989). So wurde in *in vitro* Konkurrenzexperimenten 1600 mal mehr unspezifische RNA

benötigt, um die Bildung von Rev/RRE-Komplexen auf 50% zu reduzieren, verglichen mit Komplexen aus Rev und unspezifischer RNA. Ebenso reduzierte zwar die Zugabe von einem 100fachen Überschuß an unspezifischer rRNA die Menge an hochmolekularen Komplexen aus GST-Gag mit genomischer RNA, aber zwei Assoziate unterschiedlichen Molekulargewichts hielten der 100fachen Konkurrenz stand (Damgaard *et al.*, 1998). Die Autoren schlugen daraufhin vor, daß innerhalb des HIV Genoms mindestens zwei Bindungsstellen hoher Affinität für NC-enthaltende Proteine existieren. Interessanterweise bildete NC, welches nicht an GST gekoppelt war, nur hochmolekulare Komplexe, die durch Anwesenheit unspezifischer Nukleinsäuren nicht aufgelöst werden konnten. Beobachtungen ähnlicher Art machten Stewart *et al.*, als sie *in vivo* die ca. 1000 mal effizientere Verknüpfung des vollständig prozessierten NC mit der viralen RNA, im Vergleich zum Gag-Polyprotein, feststellten (Stewart *et al.*, 1990). Die N-terminale Verlängerung von NC hat also, in Übereinstimmung mit den hier vorgelegten Daten, unterschiedliche Bindungscharakteristika zur Folge, die das Polymerisationspotential von NC an RNA stören.

Während der Virusbildung in der infizierten Zelle differenziert Gag zwischen RNA Spezies zellulären und viralen Ursprungs und verpackt spezifisch das virale RNA Genom. Der Mechanismus der Genomerkenkung ist noch immer nicht vollständig verstanden. Zwar ist bekannt, daß das Verpackungssignal ψ und die NC-Domäne von Gag ausschlaggebende Faktoren für die Initialisierung des Prozesses darstellen, aber welche ψ -Sequenzen tatsächlich verantwortlich sind, welche Stöchiometrie von RNA zu Gag für die Erkennung nötig ist, sowie welcher Zusammenhang zwischen Gag Prozessierung und den verschiedenen Funktionen von NC besteht, ist noch immer ungeklärt. Die wichtige Rolle des SL3 steht außer Frage (Clever & Parslow, 1997; Hayashi *et al.*, 1992). Allerdings könnten neben den ψ -Strukturen noch andere Bereiche in cis an der Verpackung beteiligt sein, die in den gag- und env-Genen lokalisiert wurden (Luban & Goff, 1991; Richardson *et al.*, 1993). Außerdem reduziert auch die Deletion des SL1 die Verpackung des Genoms auf 19%. SL4 und SL2 weisen neben SL3 *in vitro* ebenfalls hohe Affinitäten gegenüber NC auf (Amarasinghe *et al.*, 2000; Clever *et al.*, 1995). Da der Haupt-Spleiß-Donor der viralen RNA innerhalb des Schleifenbereichs des SL2 lokalisiert ist und somit die SL2-Struktur nur in ungespleißter RNA vollständig vorhanden ist, könnte eine direkte Erkennung des SL2 zu einer Differenzierung zwischen gespleißter und genomischer RNA führen (Mann & Baltimore, 1985; McBride & Panganiban, 1996). Um die relativ geringe spezifische Affinität von Gag zu kompensieren, müssen vermutlich mehrere spezifische Bindungsstellen zusammenwirken. Möglicherweise nimmt die ψ -Sequenz

eine gefaltete dreidimensionale Struktur ein, die wiederum von mehreren Gag-Molekülen erkannt wird. Ein potientes Modell für diese Interaktion während der Genomerkenkung ist in Abb. IV.1 gezeigt.

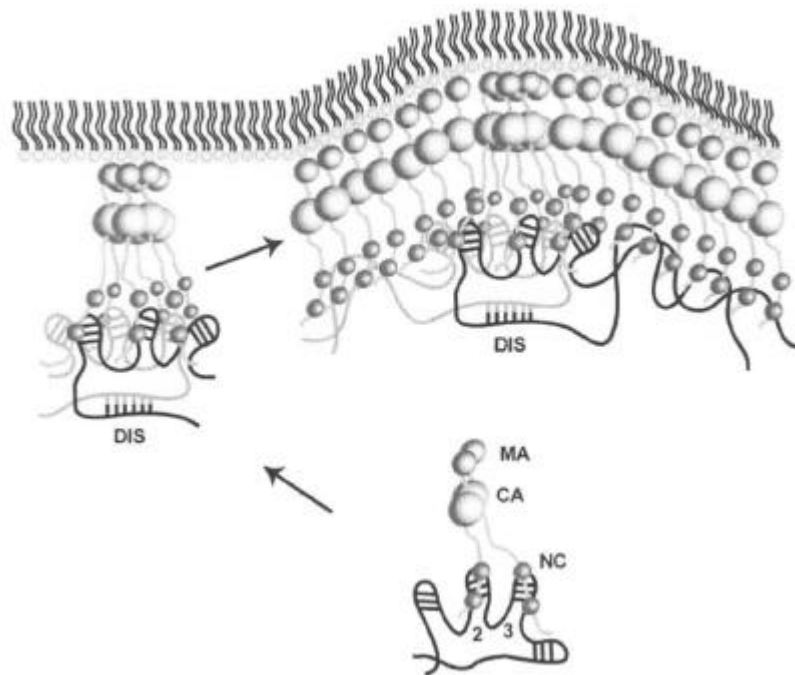


Abb. IV.1: Modell der initiiierenden Schritte der Genomerkenkung von HIV-1. Mehrere NC-Domänen des Gag-Polypeptids interagieren gleichzeitig mit verschiedenen Haarnadelstrukturelementen des dreidimensional gefalteten HIV-1 Ψ -Signals. Entnommen aus Amarasinghe *et al.* (Amarasinghe *et al.*, 2000).

Die Analysen der Strukturen von RNA/NC-Komplexen legten die Vermutung nahe, daß die primäre Funktion der in NC vorkommenden kleinen Zn-Finger-Domänen die spezifische Bindung an exponierte Guanosine ist (Amarasinghe *et al.*, 2000; De Guzman *et al.*, 1998). Es könnten daher mehrere Gag-Polypeptide gleichzeitig über Interaktionen dieser Art die Spezifität gewährleisten. Des weiteren ist denkbar, daß diese dreidimensionale RNA-Struktur neben der Exposition der spezifischen Sequenzen auch alle sterischen Bedingungen für die Interaktion mit Gag erfüllt. Die Interaktion mehrerer Gag Moleküle mit den räumlich angeordneten Bindestellen ist vermutlich vorteilhaft im Vergleich zur mehrfachen Bindung entlang einer eindimensional ausgerichteten Nukleinsäure. Diese Hypothese wird von dem Befund unterstützt, daß sich Δ MA-CA-NC-SP2-Moleküle bei der Bindung an ein 16mer mit negativer Kooperativität beeinflussen.

In der vorgelegten Arbeit wurde zum erstenmal gezeigt, daß nicht nur NC sondern auch Δ MA-CA-NC-SP2, ein fast vollständiges Gag Protein, diese Bindspezifität besitzt. Die inhärente Flexibilität N-terminaler Sequenzen von NC und der insgesamt höheren Affinitäten gegenüber spezifischen und langen unspezifischen

Nukleinsäuren scheinen die verschiedensten Interaktionen von NC nach seiner proteolytischen Spaltung zu ermöglichen. Damit ist die NC-Domäne als Teil von Gag optimal an die spezifische Erkennung der ψ -Sequenzen angepaßt, gefolgt von der unspezifischen Polymerisation entlang der RNA in ihrer vollständig prozessierten Form.

IV.6 Anwendungsmöglichkeiten der beschriebenen Systeme

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung kann eine dauerhafte Hemmung der HIV-Replikation nur über eine Mehrfachtherapie erreicht werden. Es ist dabei entscheidend, daß die verwendeten Agenzien in verschiedene Schritte des viralen Replikationszyklus eingreifen. Außerdem sollte die spezifische Hemmung viraler Prozesse gewährleistet sein, um unerwünschte Nebenwirkungen durch den Eingriff in zelluläre Abläufe vermeiden zu können.

Die hier vorgelegte Arbeit liefert Grundlagen für zwei neue antivirale Therapieansätze, welche die momentan angewendete Medikamentierung mit RT- und PR-Inhibitoren komplementieren würde. Zum einen könnte das System zur Verfolgung der Multimerisierung von Δ MA-CA-NC-SP2 dazu eingesetzt werden, um Inhibitoren der Selbstassoziation viraler Hüllproteine zu testen. Die Hemmung der viralen Assemblierung hätte den Vorteil, daß die Interaktion der viralen Hüllproteine tatsächlich virusspezifisch ist. Ein zweites potentiell Ziel der antiviralen Therapie stellt das Protein NC dar. In einer Reihe von Mutationsstudien wurde bereits gezeigt, daß die Zerstörung der Zn-Finger-Domänen, auf Grund der daraus resultierenden fehlerhaften Inkorporation des viralen Genoms, für das Virus letal ist (Rein *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang könnte nach Inhibitoren gesucht werden, welche die spezifische Interaktion von NC mit Sequenzen des Verpackungssignals unterbinden. Auch Inhibitoren dieser Art könnten zunächst in dem in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Titrationssystem, auf ihre Fähigkeit zur NC-Bindung getestet werden. Auf Grund der schnellen Anpassungsfähigkeit von HIV sollte jeder mögliche Ansatz zur Inaktivierung des Virus vertieft geprüft werden.

V Zusammenfassung

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) wird von der infizierten Zelle zunächst als unreifes Virion gebildet. Hauptbestandteil dieser Partikel sind die sphärisch angeordneten Gag-Polypoteine. Diese werden von einer Membran umhüllt, in welcher die viralen Glykoproteine enthalten sind. Gag alleine ist ausreichend für die Initialisierung der Virusbildung (Assemblierung) und die Freisetzung von virusartigen Partikeln (Knospung) von der Zelle. Neben dieser strukturbildenden Funktion ist Gag auch für die Verpackung des Plus-Strang RNA Genoms sowie für die Assoziation mit essentiellen Faktoren viralen und zellulären Ursprungs verantwortlich. Kurz nach der Knospung wird das Gag-Polyprotein von der viralen Protease in die Strukturproteine Matrix (MA), Capsid (CA) und Nukleokapsid (NC) sowie die C-terminale Domäne p6 gespalten. Die proteolytische Prozessierung ist gefolgt von einer konformationellen und örtlichen Umlagerung der Gag-Spaltprodukte: der Reifung (Maturation) des Virions zum infektiösen Virus. MA bleibt auch im reifen Virus an der Membranninnenseite verankert, CA kondensiert in die konische Proteinhülle, Kapsid, die den Nukleokapsidkomplex, bestehend aus NC und der viralen RNA, schützend umgibt.

Wesentliche Aspekte der Assemblierung und Maturation von HIV Strukturproteinen können *in vitro* mit gereinigten Proteinen nachvollzogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden derartige *in vitro* Systeme eingesetzt, um auf Fragestellungen bezüglich der Multimerisierung und Nukleinsäureinteraktion der viralen Strukturproteine einzugehen.

Der erste Teil dieser Arbeit befaßt sich mit der Funktion des in HIV-1 verpackten zellulären Proteins Cyclophilin A (CypA). CypA wird in das Virus über eine Interaktion mit CA in einem molaren Verhältnis von 1:10 (CypA/CA) eingebaut. Auf der Basis der strukturellen Analyse von CA/CypA-Komplexen wurde CypA bisher eine destabilisierende Wirkung auf die CA/CA-Wechselwirkungen im Kapsid zugeschrieben, wodurch die nach erneuter Infektion nötige Dissoziation des Kapsids erleichtert wäre.

Unter Verwendung eines *in vitro* Systems zur Multimerisierung von CA-Proteinen in kapsidähnliche, tubuläre Strukturen, wurde der Einfluß von CypA auf die Assemblierungseigenschaften von wildtyp CA und CA-Varianten untersucht, welche einen Austausch der Aminosäure Gly89 in der CypA-Bindeschleife enthielten. Alle G89-Varianten waren stark in ihrer CypA-Bindung eingeschränkt. Wildtyp CA multimerisierte in Anwesenheit von CypA in einem molaren Verhältnis von 1:10 (CypA/CA) zu etwas längeren und weniger miteinander aggregierten Zylindern,

verglichen mit CA-Zylindern, die in Abwesenheit von CypA generiert wurden. Höhere Konzentrationen an CypA unterdrückten die Zylinderbildung. Die veränderten Proteine CA(G89L) und CA(G89F) assoziierten zu vergleichbaren Strukturen, die jedoch wesentlich resistenter gegenüber den CypA-induzierten Effekten waren. Das deutete darauf hin, daß CypA seinen Einfluß auf CA durch direkte Bindung an CA ausübt. In cryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte die direkte Bindung von CA an die Außenseite der CA-Zylinder gezeigt werden. Da die CypA-Bindeschleife von CA in dessen N-terminaler Domäne lokalisiert ist, bedeutet dies, daß CA in Kapsiden vermutlich mit seiner N-terminalen Domäne nach außen und seiner C-terminalen Domäne nach innen orientiert vorliegt. Streumuster von CA-Zylindern, welche in Gegenwart von CypA gebildet wurden sprachen dafür, daß CypA Regionen lokaler Unordnung in den Zylindern induziert. Die CypA Zugabe zu präassemblierten Zylindern hatte jedoch nur geringe Effekte zur Folge: Die tubulären Strukturen dissoziierten erst nach mehrstündiger Inkubation mit einem dreifach molaren Überschuß an CypA. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß CypA bei den im Virus vorliegenden Konzentrationsverhältnissen vermutlich keine destabilisierende Wirkung auf Kapside ausübt, sondern deren Bildung eher „chaperonartig“ überwacht.

Um die *in vitro* Multimerisierungsreaktion besser zu charakterisieren, wurde ein zweites *in vitro* System etabliert, in welchem die Selbstassoziation von HIV Strukturproteinen durch Verdünnung in nukleinsäurehaltige Puffer induziert wurde. Dadurch war es möglich den zeitlichen Verlauf der Multimerisierungsreaktion zu verfolgen. Hierfür wurde das Gag-ähnliche Protein Δ MA-CA-NC-SP2 verwendet, da es die nukleinsäurebindenden Domäne NC enthält. Die Analyse des Reaktionsverlaufs ergab eine Halbwertszeit von ca. 6 min für die Assemblierung von Δ MA-CA-NC-SP2.

Das Protein Δ MA-CA-NC-SP2 lagert sich *in vitro*, abhängig vom pH-Wert, zu sphärischen (unreif) oder tubulären (reif) Strukturen zusammen und liefert damit ein Modellsystem für die während der Virusreifung ablaufenden Vorgänge. Durch die Untersuchung der pH-abhängigen Konformationsstabilität des Proteins konnten die unterschiedlichen Phänotypen nach *in vitro* Multimerisierung mit Veränderungen in der Tertiärstruktur von Δ MA-CA-NC-SP2 korreliert werden.

Im letzte Teil der Arbeit wurde die Interaktion Gag-abgeleiteter Proteine mit Nukleinsäuren analysiert. NC ist als Teil des Gag-Polyproteins für die spezifische Verpackung des HIV-Genoms durch eine direkte Interaktion mit dessen Verpackungssignal verantwortlich. Hingegen ist es im Nukleokapsidkomplex, also in seiner vollständig prozessierten Form, auf eine eher histonähnliche Weise mit der

viralen RNA assoziiert. Um zu prüfen, ob die unterschiedlichen Anforderungen an die NC-Domäne mit der Prozessierung von Gag korrelieren, wurden die Nukleinsäurebindungseigenschaften des Gag-ähnlichen Proteins Δ MA-CA-NC-SP2 mit denen von NC verglichen. Beide Proteine zeigten die gleiche Affinität gegenüber kurzen DNA-Oligonukleotiden mit zufällig ausgewählter Sequenz. Des weiteren war die Affinität von beiden Proteinen gegenüber einer strukturierten Ribonukleinsäure mit spezifischer Sequenz - der aus dem Verpackungssignal abgeleiteten SL3-Haarnadelschleifenstruktur – um mehr als das 10fache höher. Allerdings demonstrierte NC im Gegensatz zu Δ MA-CA-NC-SP2, eine fast genauso effiziente Bindung an das DNA-Analogon des SL3. Damit scheint Δ MA-CA-NC-SP2 für die Interaktion mit spezifischen Ribonukleinsäuren optimiert zu sein.

VI Literaturverzeichnis

- Accola, M. A., Ohagen, A. & Gottlinger, H. G. (2000). Isolation of human immunodeficiency virus type 1 cores: retention of Vpr in the absence of p6(gag). *J Virol* **74**(13), 6198-202.
- Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. & Martin, M. A. (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* **59**(2), 284-91.
- Aldovini, A. & Young, R. A. (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol* **64**(5), 1920-6.
- Amarasinghe, G. K., De Guzman, R. N., Turner, R. B., Chancellor, K. J., Wu, Z. R. & Summers, M. F. (2000). NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *J Mol Biol* **301**(2), 491-511.
- Baker, E. K., Colley, N. J. & Zuker, C. S. (1994). The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *Embo J* **13**(20), 4886-95.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**(4599), 868-71.
- Baudin, F., Marquet, R., Isel, C., Darlix, J. L., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1993). Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains. *J Mol Biol* **229**(2), 382-97.
- Berkowitz, R. D. & Goff, S. P. (1994). Analysis of binding elements in the human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and nucleocapsid protein. *Virology* **202**(1), 233-46.
- Berkowitz, R. D., Luban, J. & Goff, S. P. (1993). Specific binding of human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein and nucleocapsid protein to viral RNAs detected by RNA mobility shift assays. *J Virol* **67**(12), 7190-200.
- Berkowitz, R. D., Ohagen, A., Hoglund, S. & Goff, S. P. (1995). Retroviral nucleocapsid domains mediate the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging in vivo. *J Virol* **69**(10), 6445-56.
- Billich, A., Hammerschmid, F., Peichl, P., Wenger, R., Zenke, G., Quesniaux, V. & Rosenwirth, B. (1995). Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions. *J Virol* **69**(4), 2451-61.
- Birdsall, B., King, R. W., Wheeler, M. R., Lewis, C. A., Jr., Goode, S. R., Dunlap, R. B. & Roberts, G. C. (1983). Correction for light absorption in fluorescence studies of protein-ligand interactions. *Anal Biochem* **132**(2), 353-61.
- Bisswanger, H. (1979). *Theorie und Methoden der Enzymkinetik*, Verlag Chemie, GmbH, Weinheim.
- Bombarda, E., Ababou, A., Vuilleumier, C., Gerard, D., Roques, B. P., Piemont, E. & Mely, Y. (1999). Time-resolved fluorescence investigation of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein: influence of the binding of nucleic acids. *Biophys J* **76**(3), 1561-70.

- Braaten, D., Franke, E. K. & Luban, J. (1996). Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* **70**(6), 3551-60.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brun, F., Toulme, J. J. & Helene, C. (1975). Interactions of aromatic residues of proteins with nucleic acids. Fluorescence studies of the binding of oligopeptides containing tryptophan and tyrosine residues to polynucleotides. *Biochemistry* **14**(3), 558-63.
- Bukovsky, A. A., Weimann, A., Accola, M. A. & Gottlinger, H. G. (1997). Transfer of the HIV-1 cyclophilin-binding site to simian immunodeficiency virus from *Macaca mulatta* can confer both cyclosporin sensitivity and cyclosporin dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20), 10943-8.
- Campbell, S. & Rein, A. (1999). In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *J Virol* **73**(3), 2270-9.
- Campbell, S. & Vogt, V. M. (1995). Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**(10), 6487-97.
- Campbell, S. & Vogt, V. M. (1997). In vitro assembly of virus-like particles with Rous sarcoma virus Gag deletion mutants: identification of the p10 domain as a morphological determinant in the formation of spherical particles. *J Virol* **71**(6), 4425-35.
- Carteau, S., Batson, S. C., Poljak, L., Mouscadet, J. F., de Rocquigny, H., Darlix, J. L., Roques, B. P., Kas, E. & Auclair, C. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein specifically stimulates Mg²⁺-dependent DNA integration in vitro. *J Virol* **71**(8), 6225-9.
- Chen, M., Garon, C. F. & Papas, T. S. (1980). Native ribonucleoprotein is an efficient transcriptional complex of avian myeloblastosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(3), 1296-300.
- Clavel, F. & Orenstein, J. M. (1990). A mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. *J Virol* **64**(10), 5230-4.
- Clever, J., Sasseti, C. & Parslow, T. G. (1995). RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**(4), 2101-9.
- Clever, J. L. & Parslow, T. G. (1997). Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J Virol* **71**(5), 3407-14.
- Clever, J. L., Taplitz, R. A., Lochrie, M. A., Polisky, B. & Parslow, T. G. (2000). A heterologous, high-affinity RNA ligand for human immunodeficiency virus Gag protein has RNA packaging activity. *J Virol* **74**(1), 541-6.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E. (1997). *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Craven, R. C. & Parent, L. J. (1996). Dynamic interactions of the Gag polyprotein. In *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, Vol. 214, pp. 65-94.
- Daly, T. J., Cook, K. S., Gray, G. S., Maione, T. E. & Rusche, J. R. (1989). Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature* **342**(6251), 816-9.
- Damgaard, C. K., Dyhr-Mikkelsen, H. & Kjems, J. (1998). Mapping the RNA binding sites for human immunodeficiency virus type-1 gag and NC proteins within the complete HIV-1 and -2 untranslated leader regions. *Nucleic Acids Res* **26**(16), 3667-76.

- Darlix, J. L., Lapadat-Tapolsky, M., de Rocquigny, H. & Roques, B. P. (1995). First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses. *J Mol Biol* **254**(4), 523-37.
- Davis, N. L. & Rueckert, R. R. (1972). Properties of a ribonucleoprotein particle isolated from Nonidet P-40-treated Rous sarcoma virus. *J Virol* **10**(5), 1010-20.
- De Guzman, R. N., Wu, Z. R., Stalling, C. C., Pappalardo, L., Borer, P. N. & Summers, M. F. (1998). Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* **279**(5349), 384-8.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R. & Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**(6584), 661-6.
- Dickson, C., Eisenman, R., Fan, H., Hunter, E. & Reich, N. (1985). Protein biosynthesis and assembly. In *RNA Tumor Viruses* 2nd edit. (Weiss, R., Teich, N., Varmus, H. & Coffin, J., eds.), Vol. part 2, pp. 513-648. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M. & Skinner, M. A. (1990). HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *Embo J* **9**(12), 4145-53.
- Eftink, M. R. (1997). Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions. *Methods Enzymol* **278**, 221-57.
- Ehrlich, L. S., Agresta, B. E. & Carter, C. A. (1992). Assembly of recombinant human immunodeficiency virus type 1 capsid protein in vitro. *J Virol* **66**(8), 4874-83.
- Fäcke, M., Janetzko, A., Shoeman, R. L. & Krausslich, H. G. (1993). A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J Virol* **67**(8), 4972-80.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**(13), 2606-17.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. (1996a). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**(5263), 872-7.
- Feng, Y. X., Copeland, T. D., Henderson, L. E., Gorelick, R. J., Bosche, W. J., Levin, J. G. & Rein, A. (1996b). HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15), 7577-81.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. & Schmid, F. X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**(6206), 476-8.
- Fisher, R. J., Rein, A., Fivash, M., Urbaneja, M. A., Casas-Finet, J. R., Medaglia, M. & Henderson, L. E. (1998). Sequence-specific binding of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein to short oligonucleotides. *J Virol* **72**(3), 1902-9.
- Fitzon, T., Leschonsky, B., Bieler, K., Paulus, C., Schroder, J., Wolf, H. & Wagner, R. (2000). Proline residues in the HIV-1 NH₂-terminal capsid domain: structure determinants for proper core assembly and subsequent steps of early replication. *Virology* **268**(2), 294-307.
- Fleissner, E. & Tress, E. (1973). Isolation of a ribonucleoprotein structure from oncornaviruses. *J Virol* **12**(6), 1612-5.
- Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. & Leith, A. (1996). SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol* **116**(1), 190-9.

- Franke, E. K., Yuan, H. E. & Luban, J. (1994). Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**(6504), 359-62.
- Frankel, A. D. & Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25.
- Freeman, B. C., Toft, D. O. & Morimoto, R. I. (1996). Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* **274**(5293), 1718-20.
- Fu, W., Gorelick, R. J. & Rein, A. (1994). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions. *J Virol* **68**(8), 5013-8.
- Fu, W. & Rein, A. (1993). Maturation of dimeric viral RNA of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **67**(9), 5443-9.
- Fukami, A. & Adachi, K. (1965). A new method of preparation of a self-perforated micro plastic grid and its application. *J Electron Microsc (Tokyo)* **14**(2), 112-8.
- Fuller, S. D., Wilk, T., Gowen, B. E., Krausslich, H. G. & Vogt, V. M. (1997). Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle. *Curr Biol* **7**(10), 729-38.
- 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**(4648), 500-3.
- Gamble, T. R., Vajdos, F. F., Yoo, S., Worthylake, D. K., Houseweart, M., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. (1996). Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* **87**(7), 1285-94.
- Gamble, T. R., Yoo, S., Vajdos, F. F., von Schwedler, U. K., Worthylake, D. K., Wang, H., McCutcheon, J. P., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. (1997). Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **278**(5339), 849-53.
- Ganser, B. K., Li, S., Klishko, V. Y., Finch, J. T. & Sundquist, W. I. (1999). Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science* **283**(5398), 80-3.
- Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H., Ozel, M., Pauli, G. & Koch, M. A. (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**(1), 171-6.
- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D. & De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**(1), 103-12.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data [published erratum appears in *Anal Biochem* 1990 Sep;189(2):283]. *Anal Biochem* **182**(2), 319-26.
- Gitti, R. K., Lee, B. M., Walker, J., Summers, M. F., Yoo, S. & Sundquist, W. I. (1996). Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **273**(5272), 231-5.
- Greenfield, N. & Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**(10), 4108-16.
- Gross, I. (1998). In vitro Assembly Eigenschaften von bakteriell exprimierten Strukturproteinen des Humanen Immundefizienz Virus (HIV). Dissertation.
- Gross, I., Hohenberg, H., Huckhagel, C. & Krausslich, H. G. (1998). N-Terminal extension of human immunodeficiency virus capsid protein converts the in vitro assembly phenotype from tubular to spherical particles. *J Virol* **72**(6), 4798-810.

- Gross, I., Hohenberg, H. & Krausslich, H. G. (1997). In vitro assembly properties of purified bacterially expressed capsid proteins of human immunodeficiency virus. *Eur J Biochem* **249**(2), 592-600.
- Gross, I., Hohenberg, H., Wilk, T., Wiegers, K., Grättinger, M., Muller, B., Fuller, S. & Krausslich, H. G. (2000). A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. *Embo J* **19**(1), 103-13.
- Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L. & Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**(6114), 662-9.
- Harding, M. W., Handschumacher, R. E. & Speicher, D. W. (1986). Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J Biol Chem* **261**(18), 8547-55.
- Harrison, G. P. & Lever, A. M. (1992). The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol* **66**(7), 4144-53.
- Hayashi, T., Shioda, T., Iwakura, Y. & Shibuta, H. (1992). RNA packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **188**(2), 590-9.
- Hayashi, T., Ueno, Y. & Okamoto, T. (1993). Elucidation of a conserved RNA stem-loop structure in the packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *FEBS Lett* **327**(2), 213-8.
- Heaphy, S., Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M. & Skinner, M. A. (1990). HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* **60**(4), 685-93.
- Hohenberg, H., Mannweiler, K. & Muller, M. (1994). High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes. *J Microsc* **175**(Pt 1), 34-43.
- Huang, Y., Khorchid, A., Gabor, J., Wang, J., Li, X., Darlix, J. L., Wainberg, M. A. & Kleiman, L. (1998). The role of nucleocapsid and U5 stem/A-rich loop sequences in tRNA(3Lys) genomic placement and initiation of reverse transcription in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**(5), 3907-15.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**(1), 23-8.
- Jacks, T. (1990). Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons. *Curr Top Microbiol Immunol* **157**, 93-124.
- Kallen, J., Spitzfaden, C., Zurini, M. G., Wider, G., Widmer, H., Wüthrich, K. & Walkinshaw, M. D. (1991). Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Nature* **353**(6341), 276-9.
- Kay, J. E. (1996). Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem J* **314**(Pt 2), 361-85.
- Kaye, J. F. & Lever, A. M. (1996). trans-acting proteins involved in Rna encapsidation and viral assembly in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**(2), 880-6.
- Ke, H., Mayrose, D., Belshaw, P. J., Alberg, D. G., Schreiber, S. L., Chang, Z. Y., Etzkorn, F. A., Ho, S. & Walsh, C. T. (1994). Crystal structures of cyclophilin A complexed with cyclosporin A and N- methyl-4-[(E)-2-butenyl]-4,4-dimethylthreonine cyclosporin A. *Structure* **2**(1), 33-44.
- Ke, H., Mayrose, D. & Cao, W. (1993). Crystal structure of cyclophilin A complexed with substrate Ala-Pro suggests a solvent-assisted mechanism of cis-trans isomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8), 3324-8.

- Khan, R. & Giedroc, D. P. (1992). Recombinant human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid (NCp7) protein unwinds tRNA. *J Biol Chem* **267**(10), 6689-95.
- Khan, R. & Giedroc, D. P. (1994). Nucleic acid binding properties of recombinant Zn²⁺ HIV-1 nucleocapsid protein are modulated by COOH-terminal processing. *J Biol Chem* **269**(36), 22538-46.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C. & Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**(5996), 767-8.
- Klikova, M., Rhee, S. S., Hunter, E. & Ruml, T. (1995). Efficient in vivo and in vitro assembly of retroviral capsids from Gag precursor proteins expressed in bacteria. *J Virol* **69**(2), 1093-8.
- Kotov, A., Zhou, J., Flicker, P. & Aiken, C. (1999). Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* **73**(10), 8824-30.
- Kräusslich, H. G. & Welker, R. (1996). Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 25-63.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Lakowicz, J. R. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York.
- Lapadat-Tapolsky, M., De Rocquigny, H., Van Gent, D., Roques, B., Plasterk, R. & Darlix, J. L. (1993). Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle [published erratum appears in Nucleic Acids Res 1993 Apr 25;21(8):2024]. *Nucleic Acids Res* **21**(4), 831-9.
- Latt, S. A., Auld, D. S. & Valee, B. L. (1970). Surveyor substrates: energy-transfer gauges of active center topography during catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**(3), 1383-9.
- Leis, J., Baltimore, D., Bishop, J. M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S. P., Oroszlan, S., Robinson, H., Skalka, A. M., Temin, H. M. & *et al.* (1988). Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol* **62**(5), 1808-9.
- Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W. & Sodroski, J. (1989). Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol* **63**(9), 4085-7.
- Li, S., Hill, C. P., Sundquist, W. I. & Finch, J. T. (2000). Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature* **407**(6802), 409-13.
- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R. & Buchner, J. (1993). Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Protein Sci* **2**(9), 1490-6.
- Liu, J., Albers, M. W., Chen, C. M., Schreiber, S. L. & Walsh, C. T. (1990). Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6), 2304-8.
- Lochrie, M. A., Waugh, S., Pratt Jr, D. G., Clever, J., Parslow, T. G. & Polisky, B. (1997). In vitro selection of RNAs that bind to the human immunodeficiency virus type-1 gag polyprotein. *Nucleic Acids Res* **25**(14), 2902-10.
- Luan, S., Lane, W. S. & Schreiber, S. L. (1994). pCyp B: a chloroplast-localized, heat shock-responsive cyclophilin from fava bean. *Plant Cell* **6**(6), 885-92.
- Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. & Goff, S. P. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**(6), 1067-78.
- Luban, J. & Goff, S. P. (1991). Binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA to recombinant HIV-1 gag polyprotein. *J Virol* **65**(6), 3203-12.

- Mann, R. & Baltimore, D. (1985). Varying the position of a retrovirus packaging sequence results in the encapsidation of both unspliced and spliced RNAs. *J Virol* **54**(2), 401-7.
- Maurizot, J. C., Boubault, G. & Helene, C. (1978). Interaction of aromatic residues of proteins with nucleic acids. Binding of oligopeptides to copolynucleotides of adenine and cytosine. *Biochemistry* **17**(11), 2096-101.
- McBride, M. S. & Panganiban, A. T. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 encapsidation site is a multipartite RNA element composed of functional hairpin structures [published erratum appears in *J Virol* 1997 Jan;71(1):858]. *J Virol* **70**(5), 2963-73.
- McBride, M. S. & Panganiban, A. T. (1997). Position dependence of functional hairpins important for human immunodeficiency virus type 1 RNA encapsidation in vivo. *J Virol* **71**(3), 2050-8.
- Mely, Y., de Rocquigny, H., Sorinas-Jimeno, M., Keith, G., Roques, B. P., Marquet, R. & Gerard, D. (1995). Binding of the HIV-1 nucleocapsid protein to the primer tRNA(3Lys), in vitro, is essentially not specific. *J Biol Chem* **270**(4), 1650-6.
- Meric, C., Darlix, J. L. & Spahr, P. F. (1984). It is Rous sarcoma virus protein P12 and not P19 that binds tightly to Rous sarcoma virus RNA. *J Mol Biol* **173**(4), 531-8.
- Meric, C., Gouilloud, E. & Spahr, P. F. (1988). Mutations in Rous sarcoma virus nucleocapsid protein p12 (NC): deletions of Cys-His boxes. *J Virol* **62**(9), 3328-33.
- Mikol, V., Kallen, J., Pflugl, G. & Walkinshaw, M. D. (1993). X-ray structure of a monomeric cyclophilin A-cyclosporin A crystal complex at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* **234**(4), 1119-30.
- Moody, M. F. (1990). *Image analysis of electron micrographs in Biological Electron microscopy*. Reconstruction of helical objects, Academic Press Ltd, London.
- Morellet, N., Demene, H., Teilleux, V., Huynh-Dinh, T., de Rocquigny, H., Fournie-Zaluski, M. C. & Roques, B. P. (1998). Structure of the complex between the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 and the single-stranded pentanucleotide d(ACGCC). *J Mol Biol* **283**(2), 419-34.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Oertle, S. & Spahr, P. F. (1990). Role of the gag polyprotein precursor in packaging and maturation of Rous sarcoma virus genomic RNA. *J Virol* **64**(12), 5757-63.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Johnson, D. G., Kane, B. P., Sowder, R. C., 2nd, Kim, Y. D., Fisher, R. J., Zhou, X. Z., Lu, K. P. & Henderson, L. E. (2000). Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **266**(1), 42-51.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Kane, B. P., Busch, L. K., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Chertova, E. N., Arthur, L. O. & Henderson, L. E. (1996). Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **70**(11), 7734-43.
- Owen, C. H., Morgan, D. G. & DeRosier, D. J. (1996). Image analysis of helical objects: the Brandeis Helical Package. *J Struct Biol* **116**(1), 167-75.
- Pager, J., Coulaud, D. & Delain, E. (1994). Electron microscopy of the nucleocapsid from disrupted Moloney murine leukemia virus and of associated type VI collagen-like filaments. *J Virol* **68**(1), 223-32.
- Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W. & Sodroski, J. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol* **65**(1), 532-6.

- ProteinSolutions. (1998). *DynaPro Dynamic Light Scattering; Theory of operation*, Protein Solutions, Inc., Charlottesville, VA.
- Rajeswari, M. R., Montenay-Garestier, T. & Helene, C. (1987). Does tryptophan intercalate in DNA? A comparative study of peptide binding to alternating and nonalternating A.T sequences. *Biochemistry* **26**(21), 6825-31.
- Record, M. T., Jr., Lohman, M. L. & De Haseth, P. (1976). Ion effects on ligand-nucleic acid interactions. *J Mol Biol* **107**(2), 145-58.
- Reil, H., Bukovsky, A. A., Gelderblom, H. R. & Gottlinger, H. G. (1998). Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *Embo J* **17**(9), 2699-708.
- Rein, A., Henderson, L. E. & Levin, J. G. (1998). Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem Sci* **23**(8), 297-301.
- Richardson, J. H., Child, L. A. & Lever, A. M. (1993). Packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA requires cis-acting sequences outside the 5' leader region. *J Virol* **67**(7), 3997-4005.
- Rumlova-Klikova, M., Hunter, E., Nermut, M. V., Pichova, I. & Ruml, T. (2000). Analysis of Mason-Pfizer monkey virus Gag domains required for capsid assembly in bacteria: role of the N-terminal proline residue of CA in directing particle shape. *J Virol* **74**(18), 8452-9.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**(4732), 1350-4.
- Sakaguchi, K., Zambrano, N., Baldwin, E. T., Shapiro, B. A., Erickson, J. W., Omichinski, J. G., Clore, G. M., Gronenborn, A. M. & Appella, E. (1993). Identification of a binding site for the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(11), 5219-23.
- Sakalian, M., Parker, S. D., Weldon, R. A., Jr. & Hunter, E. (1996). Synthesis and assembly of retrovirus Gag precursors into immature capsids in vitro. *J Virol* **70**(6), 3706-15.
- Sakalian, M., Wills, J. W. & Vogt, V. M. (1994). Efficiency and selectivity of RNA packaging by Rous sarcoma virus Gag deletion mutants. *J Virol* **68**(9), 5969-81.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edit, Cold spring harbour laboratory press, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12), 5463-7.
- Saphire, A. C., Bobardt, M. D. & Gallay, P. A. (1999). Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans. *Embo J* **18**(23), 6771-85.
- 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 at Oxford University Press, Oxford.
- Schmid, F. X., Mayr, L. M., Mucke, M. & Schonbrunner, E. R. (1993). Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv Protein Chem* **44**, 25-66.
- Shields, A., Witte, W. N., Rothenberg, E. & Baltimore, D. (1978). High frequency of aberrant expression of Moloney murine leukemia virus in clonal infections. *Cell* **14**(3), 601-9.
- Slice, L. W., Codner, E., Antelman, D., Holly, M., Wegrzynski, B., Wang, J., Toome, V., Hsu, M. C. & Nalin, C. M. (1992). Characterization of recombinant HIV-1 Tat and its interaction with TAR RNA. *Biochemistry* **31**(48), 12062-8.
- Stewart, L., Schatz, G. & Vogt, V. M. (1990). Properties of avian retrovirus particles defective in viral protease. *J Virol* **64**(10), 5076-92.

- Stryer, L. (1987). Kapitel 27. In *Biochemie* 4. Auflage edit. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, New York.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**(1), 113-30.
- Sykes, K., Gething, M. J. & Sambrook, J. (1993). Proline isomerases function during heat shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(12), 5853-7.
- Sykora, K. W. & Moelling, K. (1981). Properties of the avian viral protein p12. *J Gen Virol* **55**(Pt 2), 379-91.
- Talbot, J. C., Dufourcq, J., de Bony, J., Faucon, J. F. & Lussan, C. (1979). Conformational change and self association of monomeric melittin. *FEBS Lett* **102**(1), 191-3.
- Tanchou, V., Gabus, C., Rogemond, V. & Darlix, J. L. (1995). Formation of stable and functional HIV-1 nucleoprotein complexes in vitro. *J Mol Biol* **252**(5), 563-71.
- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J. & Göttinger, H. G. (1994). Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**(6504), 363-5.
- Theriault, Y., Logan, T. M., Meadows, R., Yu, L., Olejniczak, E. T., Holzman, T. F., Simmer, R. L. & Fesik, S. W. (1993). Solution structure of the cyclosporin A/cyclophilin complex by NMR. *Nature* **361**(6407), 88-91.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9), 4350-4.
- Urbaneja, M. A., Kane, B. P., Johnson, D. G., Gorelick, R. J., Henderson, L. E. & Casas-Finet, J. R. (1999). Binding properties of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 to a model RNA: elucidation of the structural determinants for function. *J Mol Biol* **287**(1), 59-75.
- Urbaneja, M. A., McGrath, C. F., Kane, B. P., Henderson, L. E. & Casas-Finet, J. R. (2000). Nucleic acid binding properties of the simian immunodeficiency virus nucleocapsid protein NCp8. *J Biol Chem* **275**(14), 10394-404.
- Vartikar, J. V. & Draper, D. E. (1989). S4-16 S ribosomal RNA complex. Binding constant measurements and specific recognition of a 460-nucleotide region. *J Mol Biol* **209**(2), 221-34.
- von Schwedler, U. K., Stemmler, T. L., Klishko, V. Y., Li, S., Albertine, K. H., Davis, D. R. & Sundquist, W. I. (1998). Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly [published erratum appears in EMBO J 2000 May 15;19(10):2391]. *Embo J* **17**(6), 1555-68.
- Vuilleumier, C., Bombarda, E., Morellet, N., Gerard, D., Roques, B. P. & Mely, Y. (1999). Nucleic acid sequence discrimination by the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7: a fluorescence study. *Biochemistry* **38**(51), 16816-25.
- Vuilleumier, C., Maechling-Strasser, C., Gerard, D. & Mely, Y. (1997). Evidence and prevention of HIV-1 nucleocapsid protein adsorption onto fluorescence quartz cells. *Anal Biochem* **244**(1), 183-5.
- Welker, R., Hohenberg, H., Tessmer, U., Huckhagel, C. & Krausslich, H. G. (2000). Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**(3), 1168-77.
- Wieggers, K., Rutter, G., Schubert, U., Grättinger, M. & Krausslich, H. G. (1999). Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid. *Virology* **257**(1), 261-74.
- Wilk, T., Gowen, B. & Fuller, S. D. (1999). Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *J Virol* **73**(3), 1931-40.

- Yoo, S., Myszka, D. G., Yeh, C., McMurray, M., Hill, C. P. & Sundquist, W. I. (1997). Molecular recognition in the HIV-1 capsid/cyclophilin A complex. *J Mol Biol* **269**(5), 780-95.
- You, J. C. & McHenry, C. S. (1993). HIV nucleocapsid protein. Expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *J Biol Chem* **268**(22), 16519-27.
- Yount, G. L., Gall, C. M. & White, J. D. (1992). Limbic seizures increase cyclophilin mRNA levels in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* **14**(1-2), 139-42.
- Zhang, Y. & Barklis, E. (1995). Nucleocapsid protein effects on the specificity of retrovirus RNA encapsidation [published erratum appears in *J Virol* 1997 Jul;71(7):5712]. *J Virol* **69**(9), 5716-22.
- Zhao, Y. & Ke, H. (1996a). Crystal structure implies that cyclophilin predominantly catalyzes the trans to cis isomerization. *Biochemistry* **35**(23), 7356-61.
- Zhao, Y. & Ke, H. (1996b). Mechanistic implication of crystal structures of the cyclophilin-dipeptide complexes. *Biochemistry* **35**(23), 7362-8.

VII Anhang

VII.1 Primer

Abkürzungen für Nukleotide:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
K	Guanin und Thymin
S	Cytosin und Guanin
T	Thymin

Verwendete Oligonukleotide für Bindungsstudien:

Name	Nukleinsäuretyp	Sequenz
6mer	DNA	5'-GGCTAG-3'
16mer	DNA	5'-GGCTAGAAGGATCCAT-3'
DN16	DNA	5'-Dansyl-GGCTAGAAGGATCCAT-3'
DN20	DNA	5'-Dansyl-GGCTAGAAGGATCCATATCT-3'
73mer	DNA	5'-GGCTAGAAGGATCCATATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTA AGCGGGGGAGAATTAGATCGACCTATAGTGCAG-3'
dSL3-wt	DNA	5'-GGACTAGCGGAGGCTAGTCC-3'
dSL3-aa	DNA	5'-GGACTAGCAAAAGCTAGTCC-3'
rSL3-wt	RNA	5'-GGACUAGCGGAGGCUAGUCC-3'
rSL3-aa	RNA	5'-GGACUAGCAAAAGCUAGUCC-3'

Verwendete Primer für Klonierungen:

CA(G89)-Varianten	sense	5'-GCATCCAGTGCATGCATKSCCTATTGCACC-3'
	reverse	5'-ATGGATCCTATCACAAACTCTTGCTTTATGCCC-3'
HIV-2 CA	sense	5'-GTTCCAGCATATGCCAGTGCAACATGTAGGCGGCAAC-3'
	reverse	5'-GTCCAGAGATCTCACATTAATCTAGCTTTCTGGCC-3'
CypA	sense	5'-GTGTACGGATCCATATGGTTAACCCACC-3'
	reverse	5'-GATAAAAGGATCCCTATCATTATTCGAGTTGTCC-3'
HIV-2 CA-NC	sense	5'-GTTCCAGCATATGCCAGTGCAACATGTAGGCGGCAAC-3'
	reverse	5'-GTCCAGAGATCTCAACCTGCCTGTCTATCTGG-3'

Verwendete Primer für Sequenzierungen:

T7-Universalprimer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7-Terminatorprimer	5'-TTGCTCAGCGGTTCGAG-3'
Seq.-Gly89	5'-GCCATGCAAATGTAAAAGAGACC-3'

VII.2 Plasmide

Der Vektor pET 11c (Novagen. Madison, WI, USA) wurde als Basisvektor für die meisten Protein-Expressionsplasmide verwendet.

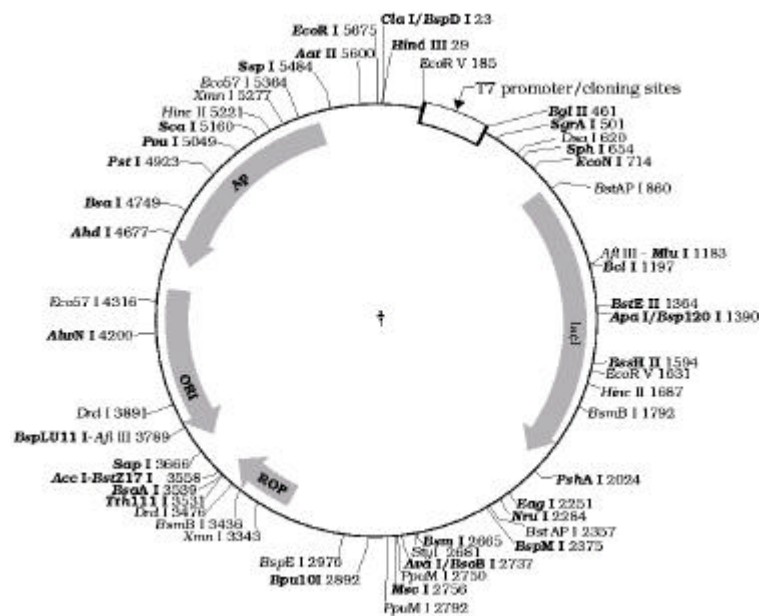


Abb. VII.1: Plasmidkarte des 5675 Basen großen pET 11c Vektors mit diversen Restriktionsschnittstellen

VII.3 Abkürzungen

A	Adenin
A	Absorption
Å	Ångström
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AIDS	„acquired immunodeficiency syndrome“, erworbene Immunschwäche
AKF	Autokorrelationsfunktion
Amp.	Ampicillin
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat

BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaar
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
BLV	Bovines Leukämievirus
BSA	„bovine serum albumin“, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CA	Capsid Protein
ca.	circa
CD	Zirkulardichroismus
CD4	Cluster Determinante (Oberflächenprotein); dient als Rezeptor für HIV
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	„counts per minute“
CsA	Cyclosporin A
C-Terminus	Carboxylterminus eines Proteins
CypA	Cyclophilin A
d	Schichttiefe
D	Dalton
Δ	Delta
DEAE	Diethylaminoethyl
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DIS	„dimer initiation site“ Dimerisierungsstelle der viralen RNA
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DN	Dansyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
	Extinktionskoeffizient
e ⁻	Elektronen
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
Env, <i>env</i>	„envelope“, Hüllprotein, Gen für das Hüllprotein Env
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
etc.	et cetera

exp	Exponent
EtOH	Ethanol
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energietransfer
FS	Signal für den Leserahmenwechsel zwischen <i>gag</i> und <i>pol</i>
g	Gramm
G	Guanin
Gag, <i>gag</i>	„group specific antigen“, virale Strukturproteine; Gen der viralen Strukturproteine
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HE	Heparin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HFV	Humanes Foamyvirus
HIV	„Human Immunodeficiency Virus“, Humanes Immundefizienz Virus
HQ	Quaternäres Polyethyleneimine
HS	Sulfopropyl
HTLV	Humanes T-Zell Leukämievirus
IN	Integrase
IP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
k	Kilo
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
K _d	Dissoziationskonstante
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LTR	„long terminal repeat“
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ mol	Mikromol
m	Milli
M	Molar
MA	Matrix
MES	2-(N-Morpholin)-Ethansulfonsäure
min	Minute

MMTV	„mouse mammary tumor virus“
MoMLV	Moloney murines Leukämie Virus
MOPS	3-(N-Morpholin)-Propansulfonsäure
MPMV	Mason-Pfizer Affenvirus
mRNA	„messenger RNA“
MRW	Molekulargewicht
MLV	Murines Leukämie Virus
n	nano
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
nat	Nativ
NBT	4-Nitrotetrazolium-Chlorid Blau
NC	Nukleokapsid
Nef, <i>nef</i>	Nef Protein, Gen für das Nef Protein
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminal eines Proteins
O	Oligo
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“ offener Leserahmen
p	Plasmid
P	Protein
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“ mit Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS	„primer binding site“ Bindestelle des Startermoleküls
PC	Phosphozellulose
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase Ketten Reaktion
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglycol
pNL4-3	bestimmter proviraler Klon von HIV-1
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase
Pol, pol	Polymerase Proteine: PR, RT, IN; Polymerase Gene
PR	Protease
Θ	Elliptizität
Θ _{MRW}	residuale Elliptizität
Ψ, psi	„packaging signal“ Verpackungssignal von HIV
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease

rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RSV	Rous Sarcom Virus
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SIV	„Simian Immunodeficiency Virus“
SL	„stemloop“, Haarnadelschleifenstruktur
sog.	sogenannt
SPR	„surface plasmon resonance“, Oberflächenplasmonenresonanz
SU	Oberflächenglykoprotein (gp120)
T	Thymin
t	Zeit
τ	Zeitkonstante
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Tat,	virales Transaktivatorprotein
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranales Glykoprotein (gp41)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	„unit“, Enzymeinheit
UV	ultraviolett
V	Volt
Viv	„viral infectivity factor“, ein akzessorisches Protein von HIV-1
Vpr	„viral protein R“, ein akzessorisches Protein von HIV-1
Vpu	„viral protein U“, ein akzessorisches Protein von HIV-1
Wt, wt	Wildtyp
w/v	Gewichts-/Volumenverhältnis
w/w	Gewichts-/Gewichtsverhältnis
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

VII.4 Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Danksagung

Die hier vorgelegte Arbeit wurde in der Abteilung für Zellbiologie und Virologie des Heinrich-Pette Instituts für experimentelle Virologie und Immunologie in Hamburg in der Zeit vom September 1997 bis Dezember 2000 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich danke ich für die Überlassung des Themas, für sein Vertrauen in meine Arbeit, für die vielen konstruktiven Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Günter Adam bedanken, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Bei Dr. Heinrich Hohenberg, Carola Huckhagel, Ingrid Ellhof und Martin Ritter möchte ich mich für die geduldige Führung bei meinen ersten Schritten am Elektronenmikroskop, für die vielen schönen Bilder, den etwas anderen Blickwinkel zur Thematik und die Unterstützung am Mac bedanken.

Für die gelungene Zusammenarbeit danke ich Prof. Dr. Steven Fuller und seinen Mitarbeitern Dennis Thomas und Thomas Wilk, die mich in die Welt der Cryo-Elektronenmikroskopie eingeführt und meine Arbeit dadurch sehr bereichert haben.

Mein besonderer Dank gilt dem Boehringer Ingelheim Fonds, durch dessen finanzielle Unterstützung mir diese Arbeit überhaupt ermöglicht wurde. Aber nicht „nur“ dafür möchte ich danken, sondern auch für die herzliche Aufnahme in die Gemeinschaft der BIF'ler, den Austausch mit Wissenschaftlern so vieler anderer biologischer Disziplinen, aus dem sogar eine Zusammenarbeit entsprang und den alljährlichen Ausflug in „meine“ Berge (die mir im hohen Norden doch etwas abgegangen sind). Es war schön ein Teil des Netzwerks zu sein. Besonders danken möchte ich natürlich meiner Betreuerin Barbara Müller dafür, daß sie immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatte und mir stets mit Rat und Tat beiseite stand. Selbst an Feiertagen oder Wochenenden war sie zum Einsatz bereit, was meine zeitlichen Fehlplanungen so manches mal erforderten.

Herrn Prof. Dr. Roger Goody möchte ich für das Gastieren in seiner Arbeitsgruppe danken und für die spontane und intensive Fernbetreuung in allen kinetischen Fragen danke ich Nicolas Thomä, der selbst seine Ostereiersuche unterbrach um mit mir über K_d s zu diskutieren.

Gerrit Präfke danke ich für seinen hitzigen Meßeifer am schönen ITC, der auch im Zusammen-Schreibstreß nicht nachließ (so sind sie, die BIF'ler...) und die ganze Hintergrundinformation zum Thema Ruhrgebiet

Ein Dankeschön auch an Ingolf Gross, der durch seine Arbeit den Grundstein für die meine gelegt hat.

Für die vielen Stunden im „Spaßlabor“ danke ich der ganzen Abteilung 4. Und für die Ein-, bzw. Fortführung der Doktorandenseminare, die so manchen kulinarischen Höhepunkt bargen danke ich Daniela, Denis, Frauke, Harry, Hormozd, Jens, Jessi, Lars und Steffi. Für ihre nicht ermüdenden Durchhalteparolen möchte ich mich nochmals bei Barbara, Daniela (nicht nur dafür) und Matthias bedanken.

Meinen größten Dank schulde ich Fritz, der immer wieder meine Hektikanfälle gebremst hat und einfach immer für mich da war. Neben dieser seelischen Unterstützung war auch sein fachlicher Beistand, sei es in mathematischen, physikalischen oder Computer-technischen Fragen unentbehrlich (eben ein Mann für alle Fälle).

Schließlich bleibt es mir noch, mich bei meinen Eltern zu bedanken, daß sie mir das Studieren überhaupt ermöglichten und mich auch in der Ferne unterstützten.

Publikationen

Auerbach, G., Jacob, U., Grättinger, M., Schurig, H. and Jaenicke, R. (1997). Crystallographic analysis of phosphoglycerate kinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biol. Chem.* **378**, 327-329.

Auerbach, G., Huber, R., Grättinger, M., Zaiss, K., Schurig, H., Jaenicke, R. and Jacob, U. (1997). Closed structure of phosphoglycerate kinase from *Thermotoga maritima* reveals the catalytic mechanism and determinants of thermal stability. *Structure* **5**, 1475-1483.

Grättinger, M., Dankesreiter, D., Schurig, H. and Jaenicke, R. (1998). Recombinant phosphoglycerate kinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Catalytic, spectral and thermodynamic properties. *J. Mol. Biol.* **280**, 525-533.

Grättinger, M., Hohenberg, H., Thomas, D., Wilk, T., Müller, B. and Kräusslich, H.-G. (1999). *In vitro* Assembly of wild-type and Cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of Cyclophilin A. *Virology* **257**, 247-260.

Wiegers, K., Rutter, G., Schubert, U., Grättinger, M. and Kräusslich, H.-G. (1999). Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid. *Virology* **257**, 261-274.

Gross, I., Hohenberg, H., Wilk, T., Wiegers, K., Grättinger, M., Müller, B., Fuller, S. and Kräusslich, H.-G. (2000). A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. *EMBO*. **19**. 103-113.

Jacob, U., Huber, R., Auerbach, G., Grättinger, M., Zaiss, K., Schurig, H. and Jaenicke, R. (1997). Phosphoglycerate kinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Structure and thermal stability.

Posterbeitrag bei der „2nd European Protein Science Conference“ in Cambridge.

Grättinger, M., Gross, I., Müller, B., Hohenberg, H. und Kräusslich, H.-G. (1998). Einfluß von Cyclophilin A auf die *in vitro* Assembly-Eigenschaften von HIV Capsid Proteinen. Posterbeitrag bei der „Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie“ im März 1998 in Regensburg.

Grättinger, M., Thomä, N., Müller, B., Alexandrow, K., Goody, R.S. and Kräusslich, H.-G. (2000). The affinity of non-specific nucleic acid binding increases upon cleavage of HIV-1 NC protein from the Gag-polyprotein. Vortrag bei der „Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie“ im April 2000 in Wien.

Grättinger, M., Müller, B., Alexandrow, K., Goody, R.S., Kräusslich, H.-G. and Thomä, N. (2000). Fluorescence measurements of Gag-derived proteins to determine their affinities for nucleic acids. Posterbeitrag bei dem „Virus Assembly Meeting“ der FASEB summer research conferences im Juni 2000 in Saxtons River, Vermont, USA.

Grättinger, M., Müller, B., Alexandrow, K., Goody, R.S., Kräusslich, H.-G. and Thomä, N. (2000). Fluorescence measurements of Gag-derived proteins to determine their affinities for nucleic acids. Posterbeitrag bei dem „Retrovirus Assembly Meeting (RAM)“ im Oktober 2000 in Prag.

Lebenslauf

von: **Mira Grättinger**

Persönliche Daten: geboren am 28.12.1971 in Starnberg

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1978 – 82 Grundschule Starnberg
1982 – 91 Gymnasium Starnberg, in Starnberg
10.07.91 Abitur

Hochschulstudium: 1991 – 1997

Biologiestudium an der Universität Regensburg

11/91 – 11/93 Grundstudium

11/93 – 05/97 Hauptstudium

Hauptfach: Biochemie

Nebenfächer: Mikrobiologie, Zellbiologie, org. Chemie

09/94 – 06/95 Auslandsstudium

an der Wesleyan University, Middletown, CT, USA

als „visiting exchange scholar“

im „graduate student“ Programm

in der Abteilung: „Molecular Biology & Biochemistry“

06/96 – 05/97 Diplomarbeit an der Universität Regensburg

am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie

unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Jaenicke

Thema: Untersuchungen zu Stabilität, Faltung und

Struktur von Phosphoglycerat Kinase sowie zur Struktur

des PGK-TIM-Fusionsproteins aus dem

hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima*

05.05.97 Erhalt des Diploms von der Universität Regensburg

Promotion: 09/97 – 12/00 am Heinrich-Pette Institut (HPI), Hamburg
in der Abteilung für Zellbiologie und Virologie
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-G. Kräusslich
Thema: Charakterisierung der *in vitro* Assemblierung und
Nukleinsäureinteraktion von HIV Strukturproteinen
Gefördert durch ein Stipendium
des Boehringer Ingelheim Fonds