

**Die biochemische Analyse
der Proteinacetylierung
am Beispiel des HIV-1 Tat Proteins**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Dipl. Biochem.
Wilma Dormeyer

Bochum / Heidelberg, Dezember 2003

I Vorbemerkung

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, in der Zentralen Proteinanalytik bei Dr. Martina Schnölzer in Zusammenarbeit mit der Angewandten Tumorstudiologie bei Dr. Melanie Ott, jetzt am Gladstone Institute of Virology and Immunology der University of California, San Francisco, angefertigt.

Die mündliche Promotionsprüfung findet an der Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum statt.

In diesem Zusammenhang danke ich besonders meinem Erstprüfer Prof. Helmut E. Meyer vom Medizinischen Proteom-Center des Zentrums für klinische Forschung der Ruhr-Universität Bochum für seine Unterstützung.



II Danksagung



Ich danke meiner ersten Betreuerin Martina Schnölzer für die intensive Betreuung, ihr Verständnis für alle Rückschläge und Probleme, ihr begeistertes Interesse an meiner Arbeit und die vielen wissenschaftlichen Freiheiten, die ich am DKFZ genießen durfte. Martina, es war mir eine Ehre und eine Freude, Deine erste Doktorandin zu sein.



Ich danke ebenso sehr meiner zweiten Betreuerin Melanie Ott für die überaus herzliche Aufnahme einer Proteinanalytikerin in ihr virologisches Labor, ihre enthusiastische Unterstützung meiner Arbeit und ihren fachlichen und für mich oft auch persönlich wertvollen Rat.



Ich danke meinen Dozenten Prof. Dr. Helmut E. Meyer, Prof. Dr. Rolf Heumann und Prof. Dr. Christof Wöll für die Begutachtung dieser Arbeit und ihre Bereitschaft, als Prüfungskommission meiner Promotion zu fungieren.



Ich danke Claudia Hetzer-Egger für die geduldige Anleitung zu den zell- und molekularbiologischen Experimenten, ihre allzeitige Hilfsbereitschaft und die gutgelaunte Überwindung aller Hindernisse im schließenden Ott-Labor. Cläuschen, es war schön und nicht nur fachlich lehrreich, mit Dir zu arbeiten.



Ich danke allen „Ottifanten“ der Angewandten Tumorstudiologie für die angenehme und produktive Zusammenarbeit. Besonders danke ich Alexander Dörr für die Bereitsstellung der Acetyltransferasen, Angelika Pedal und Katrin Kählcke für ihre bereitwillige Hilfe im Labor sowie für die schöne Zeit in San Francisco und Anja Speyerer für die fröhliche Gesellschaft an einsamen Labortagen.



Ich danke allen Mitgliedern der Zentralen Proteinanalytik für die nette Zusammenarbeit und die Kaffeekränzchen in Keller und Küche. Besonders danke ich Tore Kempf, Bettina Helfert und Sabine Fiedler für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Edman Sequenzierung und der MALDI TOF MS. Der „Formatierungspolizei“ Uwe Warnken danke ich für seine große Hilfe bei der Gestaltung dieser Arbeit.



Ich danke Hans-Richard Rackwitz und Peter Henklein für die schnelle und zuverlässige Synthese aller in dieser Arbeit verwendeten Peptide und Proteine.



Ich danke Agnes Hotz-Wagenblatt für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Hilfe bei der computergestützten Analyse der Acetyltransferase-Substrate.



Ich danke meinen Freunden, insbesondere Imke Polschinski, Melanie Bier und Tobias Lau für all die kleinen und großen Dinge, mit denen sie mein Leben bereichern.



Von Herzen danke ich meiner Mutter und meiner Großmutter für ihre Liebe, ihre Unterstützung und ihr Vertrauen. Mama und Oma, Ihr seid mein seelischer Rückhalt.

III Publikations- und Präsentationsverzeichnis

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erschienene Publikationen und Präsentationen:

Dormeyer, W., Dorr, A., Ott, M., Schnölzer, M. (2003) Acetylation of the HIV-1 Tat protein: an in vitro study. *Anal Bioanal Chem* 376 (7), 994-1005.

Dormeyer, W., Dorr, A., Ott, M., Schnölzer, M. (2003) Lysines and cysteines are both targets for acetylation in the HIV-1 Tat protein. Poster at the Proteomic Forum, Munich, Germany, September 14-17.

Dormeyer, W., Dorr, A., Ott, M., Schnölzer, M. (2003) Enzymatic and non-enzymatic acetylation of the HIV-1 Tat protein: an in vitro study. Poster at the 6th International Symposium on Mass Spectrometry in the Health and Life Sciences: Molecular and Cellular Proteomics, San Francisco, USA, August 24-28.

Dormeyer, W., Dorr, A., Ott, M., Schnölzer, M. (2003) Enzymatic and nonenzymatic acetylation of the HIV-1 Tat protein: an in vitro study. Poster at the 51st ASMS Conference, Montreal, Canada, June 8-12.

Dormeyer, W., Dorr, A., Ott, M., Schnölzer, M. (2002) Analysis of enzymatic and nonenzymatic acetylation of the HIV-1 Tat. Poster at the Annual Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, USA, May 21-26.

Dormeyer, W., Dorr, A., Schnölzer, M., Ott, M. (2002) Analysis of HIV-1 Tat acetylation: enzymatic acetylation of lysine 50 by p300 and pCAF and nonenzymatic acetylation of multiple cysteines. Poster at the Annual Meeting on Virology, Erlangen, Germany, April 8-11.

Weitere Publikationen:

Sickmann, A., Dormeyer, W., Wortelkamp, S., Voitalla, D., Kuhn, W., Meyer, H.E. (2002) Towards a high resolution separation of human cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 771, 167-96.

Lutter, P., Meyer, H.E., Langer, M., Witthohn, K., Dormeyer, W., Sickmann, A., Bluggel, M.. (2001) Investigation of charge variants of rViscumin by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 22, 2888-97.

Sickmann, A., Dormeyer, W., Wortelkamp, S., Voitalla, D., Kuhn, W., Meyer, H.E. (2000) Identification of proteins from human cerebrospinal fluid, separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 21, 2721-8.

IV Abkürzungsverzeichnis

2D PAGE	two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
AcCoA	Acetyl Coenzym A
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ARM	arginine-rich motif
BAF	barrier of autointegration factor
CA/p24	capsid
CBP	CREB-binding protein
CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin dependent kinase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHR	cysteine-histidine-rich region
CMV	Cytomegalievirus
CREB	cAMP-response element-binding
CRR	cysteine-rich region
CTD	carboxyterminal domain
C-Terminus	Carboxyterminus
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Da	Dalton
DNA	deoxyribonucleic acid
DSIF	DRB-sensitivity inducing factor
Env	envelope
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	electrospray ionisation
FAT	factor acetyltransferase
Gag	group-specific antigen
GNAT	Gcn5-related N-acetyltransferase
HAART	highly active antiretroviral therapy
HAT	histone acetyltransferase
HIV	human immunodeficiency virus
HMG	high mobility group
HPLC	high pressure liquid chromatography
IN	integrase
I κ B	NF κ B Inhibitor
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIX	KID-interacting
LC	liquid chromatography
LTR	long terminal repeat
m/z	mass/charge ratio

MA	matrix
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	mass spectrometry
MYST	MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60 acetyltransferase
NAT	N-acetyltransferase
NC	nucleocapsid
NELF	negative elongation factor
NFκB	nuclear factor κB
NLS	nuclear localisation signal
NMR	nuclear magnetic resonance
N-Terminus	Aminoterminus
Nuc-1	nucleosome 1
PA	polyacrylamide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
pCAF	p300/CBP-associated factor
PITC	Phenylisothiocyanat
Pol	polymerase
PR	protease
PSD	post source decay
pTEFb	positive-acting transcription elongation factor
PTH	Phenylthiohydantoin
R	repeat
RNA	ribonucleic acid
RP	reversed phase
RT	reverse transcriptase
SDS	sodium dodecylsulfate
sek	Sekunden
siRNA	small interfering ribonucleic acid
ss RNA	single-stranded ribonucleic acid
SU/gp120	surface glycoprotein
TAF	TBP-associated factor
TAR	transactivation responsive
Tat	transactivator of transcription
TF	transcription factor
TM/gp41	transmembrane glycoprotein
TOF	time of flight
U3	unique 3'
U5	unique 5'

V Inhaltsverzeichnis

I Vorbemerkung

II Danksagung

III Publikations- und Präsentationsverzeichnis

IV Abkürzungsverzeichnis

V Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	HIV und AIDS	3
2.1.1	Die AIDS Pandemie	3
2.1.2	Die HIV-1 Infektion	3
2.1.3	Der HIV-1 Lebenszyklus	5
2.1.4	Das HIV-1 Tat Protein	8
2.1.5	Die Chromatinstruktur in der retroviralen Transkription	11
2.2	Die Acetylierung von Proteinen durch Acetyltransferasen	12
2.2.1	Die Klassifizierung von Acetyltransferasen	13
2.2.2	Die Acetyltransferase p300/CBP	16
2.2.3	Die Acetyltransferase pCAF	19
2.3	Die Analyse der Proteinacetylierung	21
3	Zielsetzung	23
4	Material und Methoden	25
4.1	Material	25
4.1.1	Chemikalien	25
4.1.2	Nukleotide, Nucleinsäuren, Aminosäuren, Peptide und Proteine	26
4.1.3	Enzyme und Antikörper	26
4.1.4	Zellkulturmaterialien	27
4.1.5	Reagentien, Lösungen und Baukästen	27
4.1.6	Laborwaren und Geräte	28
4.2	Methoden	29
4.2.1	Proteinanalytische Methoden	29
4.2.1.1	Peptid- und Proteinsynthese	29
4.2.1.2	Präparative RP HPLC-Trennung der Peptidgemische	29
4.2.1.3	<i>In vitro</i> Acetylierung von Peptiden und Proteinen	30
4.2.1.4	Endoproteinase Lys-C Verdau von Peptiden und Proteinen	30
4.2.1.5	MALDI TOF Massenspektrometrie	31
4.2.1.6	Peptidsequenzierung nach Edman	32

4.2.2	Zellbiologische Methoden	33
4.2.2.1	Kultivierung der Zelllinien Cos7 und 1G5	33
4.2.2.2	Lagerung von Zelllinien	34
4.2.2.3	Bestimmung der Zellzahl	34
4.2.2.4	Transiente Transfektionen	34
4.2.2.4.1	Aussäen von Zellen für transiente Transfektionen	35
4.2.2.4.2	DEAE-Dextran vermittelte Transfektion von 1G5 Zellen	35
4.2.2.4.3	Lipofectamin-vermittelte Transfektion von Cos7 Zellen	36
4.2.2.5	Vollständiger Zellaufschluss	36
4.2.2.6	Präparation von nukleären Extrakten	37
4.2.2.7	Quantifizierung der Luciferase Aktivität	37
4.2.3	Molekularbiologische Methoden	38
4.2.3.1	Herstellung von Tat Mutanten Plasmiden durch ortsspezifische Mutagenese	38
4.2.3.2	Sequenzierung der Tat Mutanten Plasmid DNA	39
4.2.3.3	Isolation von Plasmid DNA aus Bakterienzellen	40
4.2.3.3.1	Isolation von Plasmid DNA im kleinen Maßstab (Miniprep)	41
4.2.3.3.2	Isolation von Plasmid DNA im großen Maßstab (Maxiprep)	41
4.2.3.4	Phenol Chloroform Extraktion von Plasmid DNA	41
4.2.3.5	Präzipitation von Plasmid DNA	42
4.2.3.6	Quantifizierung von Plasmid DNA	42
4.2.3.7	Restriktionsverdau von Plasmid DNA	42
4.2.3.8	Agarose Gelelektrophorese	42
4.2.4	Proteinbiochemische Methoden	43
4.2.4.1	Quantifizierung von Proteinen durch Bradford Analyse	43
4.2.4.2	<i>In vitro</i> Translation von Plasmid DNA	43
4.2.4.3	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)	44
4.2.4.4	Protein RNA Interaktionsstudie	45
4.2.5	Immunologische Methoden	46
4.2.5.1	Western Blot Analysen	46
4.2.5.2	Coimmunpräzipitation von Tat Proteinen	47
5	Ergebnisse	49
5.1	Die enzymatische Acetylierung von HIV-1 Tat durch die p300 Acetyltransferase	49
5.1.1	p300 acetyliert das ARM von Tat	49
5.1.2	p300 acetyliert Lysin 50 im ARM von Tat	50
5.1.3	Einfluss der umgebenden Peptidsequenz auf die Acetylierung von Lysin 50 durch p300	56
5.1.4	Einfluss von sauren Aminosäureresten auf die transkriptionelle Transaktivität von Tat	61

5.2	Statistische Analyse von p300 Substraten	65
5.2.1	p300 Substrate zeigen gleichartige Aminosäurehäufigkeiten	65
5.2.2	Erzeugung von p300 Acetylierungsstellen	68
5.2.3	Datenbanksuche nach neuen p300 Substraten	72
5.3	Die enzymatische Acetylierung von HIV-1 Tat durch die pCAF Acetyltransferase	74
5.3.1	pCAF acetyliert das ARM von Tat	74
5.3.2	pCAF acetyliert Lysin 50 im ARM von Tat	77
5.4	Die nichtenzymatische Acetylierung von Cysteinen in HIV-1 Tat	81
5.4.1	Die Tat CRR wird mehrfach nichtenzymatisch acetyliert	81
5.4.2	Die mehrfache nichtenzymatische Acetylierung der Tat CRR ist unabhängig von der Anwesenheit von Lysinen	83
5.4.3	Die mehrfache nichtenzymatische Acetylierung der Tat CRR ist abhängig von der Anwesenheit von ungeschützten Cysteinen	84
5.4.4	Die nichtenzymatische Acetylierung von Cysteinen ist unabhängig von der Aminosäuresequenz eines Peptids	85
5.4.5	Die Tat Kernregion wird nichtenzymatisch an dem enthaltenen Cystein acetyliert	89
5.4.6	Cystein ist die einzige proteinogene Aminosäure mit enzymunabhängiger Acetylgruppenakzeptorfunktion	91
5.4.7	Acetyl-Cysteine der Tat CRR können als Acetylgruppendonoren dienen	92
6	Diskussion	95
6.1	Die Charakterisierung von Acetylierungsstellen mit Hilfe der Massenspektrometrie und der Edman Sequenzierung	95
6.2	Die Acetylierung von Tat durch Acetyltransferasen	98
6.2.1	Die Acetylierung von Lysin 50 im Arginin-reichen Motiv von Tat durch p300	98
6.2.2	Die Acetylierung von Lysin 50 im Arginin-reichen Motiv von Tat durch pCAF	99
6.2.3	Die unterschiedlichen Funktionen von Tat in der HIV-1 Transkription nach Acetylierung durch p300 und pCAF	100
6.2.4	Die Auswirkungen der Lysin 50 Acetylierung auf die molekularen Eigenschaften von Tat	103
6.3	Die nichtenzymatische Acetylierung von Tat	105
6.3.1	Die nichtenzymatische Acetylierung von Cysteinen in der Cystein-reichen Region von Tat	105
6.3.2	Die Beachtung der nichtenzymatischen Cystein-Acetylierung bei der Charakterisierung von Acetylierungsstellen in Proteinen	106
6.3.3	Die möglichen Funktionen von Tat nach nichtenzymatischer Acetylierung der Cystein-reichen Region	107
6.4	Die Substratspezifität von Acetyltransferasen	108
6.4.1	Die Suche nach einer Konsensussequenz der Acetylierung durch p300	108

7	Anhang	113
7.1	Verwendete Peptide	113
7.2	Verwendete Peptidgemische	114
7.3	Verwendete Oligonukleotid-Primer	116
7.4	Substrate der Acetyltransferase p300	117
7.5	Natürliche Häufigkeiten von Aminosäuren	120
8	Literaturverzeichnis	121
9	Lebenslauf	141

1 Zusammenfassung

Das HIV-1 Tat Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der transkriptionellen Aktivität des integrierten HIV-1 Provirus. In diesem Zusammenhang bindet Tat mit hoher Affinität an eine charakteristische RNA Struktur am 5' Ende aller HIV-1 Transkripte und erhöht die Elongationseffizienz der RNA Polymerase II durch Rekrutierung des essentiellen pTEFb-Elongationskomplexes zum Promotor. Zusätzlich interagiert Tat mit zellulären Cofaktoren, darunter die Acetyltransferasen p300/CBP und pCAF, und wird selbst durch p300/CBP an Lysin 50 acetyliert. Die Lysin 50-Acetylierung ist notwendig für die transaktivierende Wirkung von Tat auf die HIV-1 Transkription.

In dieser Arbeit wurde auf Peptid- und erstmals auch auf Proteinebene bestätigt, dass Lysin 50 die einzige Acetylierungsstelle der Acetyltransferase p300 in Tat ist. Weiterhin ergab die Analyse von Tat Mutantenpeptiden, dass saure Aminosäuren in Position 49 (Lys-1) und 48 (Lys-2) die Acetylierung verhindern. Die entsprechenden Tat Mutantenproteine zeigten in transienten Transfektionsstudien eine dramatische Abnahme der transkriptionellen Transaktivität. Dieser *in vivo* Effekt muss auf der verhinderten Acetylierung von Lysin 50 beruhen, da andere Tat Funktionen wie die RNA- und Cofaktor-Bindung oder die nukleäre Lokalisation unbeeinflusst blieben. Übereinstimmend ergab die statistische Analyse aller bekannten p300 Substratproteine ein seltenes Vorkommen von sauren Aminosäureresten in direkter Umgebung der Acetylierungsstelle und erlaubte die Aufstellung mehrerer Aminosäuresequenzen, in denen Lysine mit erhöhter Wahrscheinlichkeit der Acetylierung durch p300 unterliegen. Tatsächlich führten Datenbanksuchen mit diesen Sequenzen zur Identifizierung neuer Substrate von p300.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Tat auch von der Acetyltransferase pCAF acetyliert wird. Als einzige Acetylierungsstelle wurde wiederum Lysin 50 identifiziert. *In vivo* sorgt vermutlich p300 für die initiale Lysin 50-Acetylierung und ermöglicht so eine effiziente transkriptionelle Elongation, wohingegen pCAF die Lysin 50-Acetylierung während des gesamten Transkriptionszyklus aufrecht erhält. Überraschend wurde ausserdem festgestellt, dass Cysteinreste unabhängig von der umgebenden Peptidsequenz als enzymunabhängige Acetylgruppenakzeptoren fungieren und dadurch die Acetylgruppe für eine enzymatische Acetylierung von Lysinen bereithalten können. Die Vernachlässigung der nichtenzymatischen Cystein-Acetylierung kann zur fehlerhaften Interpretation von Acetylierungsstudien führen. Insgesamt demonstriert die vorliegende Arbeit den Nutzen proteinanalytischer Methoden wie der MALDI TOF MS, des proteolytischen Verdaus und der Edman Sequenzanalyse zur schnellen und umfassenden Charakterisierung von acetylierten Peptiden und Proteinen.

2 Einleitung

2.1 HIV und AIDS

AIDS (acquired immunodeficiency sndrome) ist das Endstadium einer chronischen Infektionskrankheit, die durch das HIV (human immunodeficiency virus) hervorgerufen wird und auf der kontinuierlichen Zerstörung von CD4⁺ T-Lymphozyten beruht. Kennzeichnend für dieses Endstadium ist der Zusammenbruch der zellulären Immunabwehr und der Tod des Patienten durch Tumore oder opportunistische, gemeinhin nicht letale Krankheiten.

2.1.1 Die AIDS Pandemie

Nach den 1981 vermehrt auftretenden Fällen von AIDS wurde 1983 erstmals das HIV aus infizierten Lymphozytenkulturen isoliert und 1984 als Erreger von AIDS identifiziert [Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984]. Die UNAIDS Organisation schätzt die heutige Zahl der HIV Träger auf weltweit 42 Millionen, darunter 3,3 Millionen Kinder. Trotz zahlreicher Maßnahmen bezüglich der Aufklärung über die Ursachen der HIV Erkrankung und ihrer Prävention infizierten sich im Jahr 2002 4,2 Millionen Menschen mit HIV, und trotz des erfolgreichen Einsatzes von Anti-HIV Medikamenten in der HAART (highly active antiretroviral therapy) starben 3,1 Millionen Menschen an den Folgen von AIDS. Damit summiert sich die Zahl von AIDS Toten seit der Entdeckung der Erkrankung auf 25 Millionen.

Das Zentrum der Pandemie liegt im südlichen Afrika, wo im Jahr 2002 29,5 Millionen Menschen mit HIV lebten und 2,3 Millionen AIDS Erkrankte starben. Die erschreckend hohe HIV Prävalenz von 9% im südlichen Afrika verglichen mit einer Prävalenz von 0,3% im westlichen Europa ist hauptsächlich auf soziologische und finanzielle Gründe zurückzuführen, denn noch immer sind in diesem Teil der Welt Aufklärung und Prävention der HIV Erkrankung mangelhaft, und von zehn HIV Infizierten hat dort nur einer Zugang zur medikamentösen Therapie.

2.1.2 Die HIV-1 Infektion

HIV-1 und das kaum verbreitete, weniger virulente HIV-2 werden durch Körperflüssigkeiten übertragen und infizieren CD4⁺-Immunzellen, hauptsächlich T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen [Margolick et al., 1987]. HIV-1 nutzt zu seinem Eintritt den CD4 Rezeptor und die Corezeptoren CCR5 oder CXCR4 [Dalglish et al., 1984]. In den frühen Stadien der

Erkrankung herrscht die antigenabhängige Infektion von T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen unter der Nutzung des Chemokinrezeptors CCR5 vor [Deng et al., 1996], wohingegen nach Aktivierung der zellulären Immunantwort die antigenunabhängige T-Zellaktivierung und damit die Infektion von T-Lymphozyten durch den Chemokinrezeptor CXCR4 in den Vordergrund tritt [Feng et al., 1996]. Der Übergang von der CCR5- in die CXCR4-abhängige Phase der Infektion bedingt die rapide Zerstörung von $CD4^+$ T-Lymphozyten, die im Folgenden langsam, aber kontinuierlich voranschreitet (Abb. 2.1) [Fauci, 1988; Scarlatti et al., 1997]. Es ist noch unklar, ob es sich dabei um einen cytopathogenen Effekt von HIV-1 auf die infizierte Zelle selbst oder um den direkt durch HIV-1 oder indirekt durch das hyperaktivierte Immunsystem ausgelösten Zelltod von nichtinfizierten Zellen handelt [Hazenberg et al., 2000].

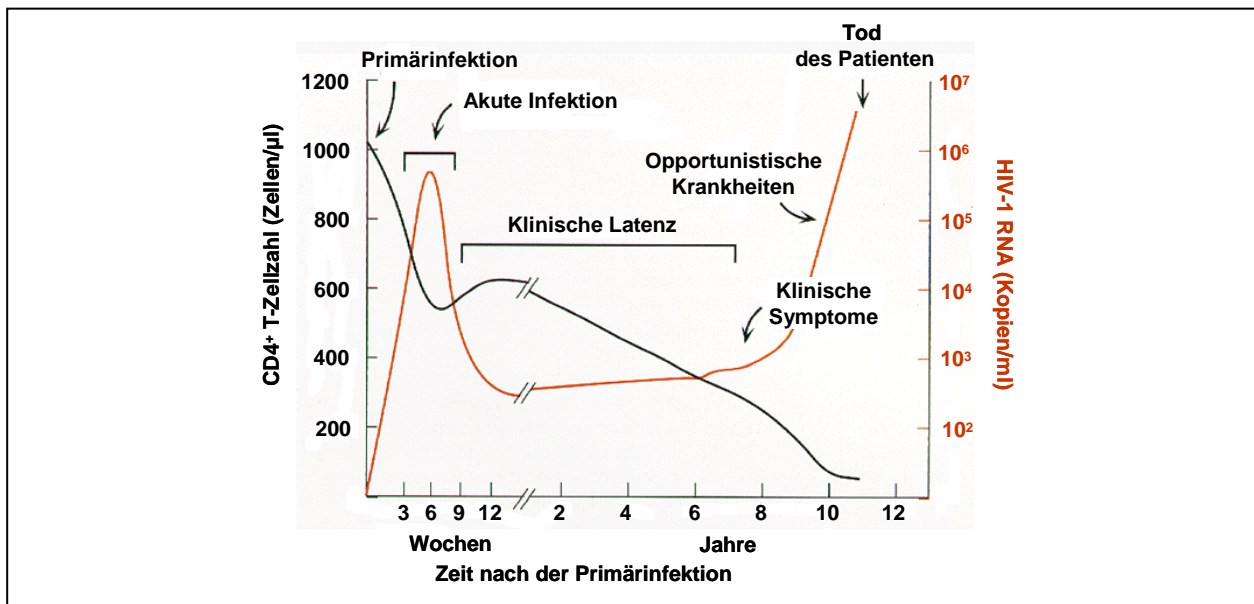


Abb. 2.1: Krankheitsverlauf der HIV-1 Infektion (nach: Coffin, J. M., Hughes, S. H., Varmus, H. E. (1997) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Parallel zum initialen Abfall der $CD4^+$ T-Zellzahl kommt es zu einem dramatischen Anstieg der viralen Replikation, die unter Kontrolle von cytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen auf einen geringeren Wert herabreguliert wird, aber während des gesamten Krankheitsverlaufs in den befallenen Lymphknoten voranschreitet [Pantaleo and Fauci, 1995; Ho et al., 1995]. Sie ist die Voraussetzung für die hohe genetische Variabilität der viralen T-Zellepitope, die der Widerstandsfähigkeit des Virus gegen die einsetzende zelluläre Immunantwort und der chronischen Infektion zugrunde liegt [McMichael and Phillips, 1997]. Zusätzlich baut HIV-1 im Rahmen einer transkriptionellen Latenz ein persistierendes virales Reservoir in infizierten T-Gedächtniszellen auf, in denen das Provirus aufgrund des inaktiven Status seiner Wirtszelle erst nach deren Aktivierung transkribiert wird. Da die heute eingesetzten antiretroviralen Medikamente die replikativen Virusenzyme Reverse Transkriptase und Protease zum Ziel haben,

sind sie unwirksam gegen diese ruhenden Proviren. Damit kann auch HAART nicht zur vollständigen Elimination von HIV-1 führen, und der Krankheitsverlauf setzt sich nach Absetzen der Medikamente fort [Finzi et al., 1997].

Die transkriptionelle Latenz kann bis zu zehn Jahre andauern und ist mit wenigen klinischen Symptomen verbunden. Sobald jedoch die $CD4^+$ T-Zellzahl aufgrund der persistierenden Infektion unter einen Schwellenwert von 200 Zellen/ μ l Blut abfällt, bricht die Architektur der lymphoiden Gewebe und damit die zelluläre Immunabwehr zusammen. Infektionen mit Mikroorganismen wie *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Pneumocystis carinii* oder das Cytomegalievirus (CMV), die sonst unter der immunologischen Kontrolle von $CD4^+$ T-Lymphozyten stehen, sowie maligne Tumore wie das atypische non-Hodgkin Lymphom oder das Kaposi-Sarkom bestimmen dann das finale Stadium der AIDS Erkrankung.

2.1.3 Der HIV-1 Lebenszyklus

HIV-1 gehört zur Familie der Retroviren und zur Unterfamilie der Lentiviren. Entsprechend sind die reverse Transkription der genomischen RNA (ribonucleic acid) in die komplementäre DNA (cDNA, complementary deoxyribonucleic acid) und die Integration des Provirus in das menschliche Genom die Grundvoraussetzungen der fortschreitenden HIV-1 Infektion. Das virale Partikel enthält zwei Moleküle einzelsträngige RNA, die in einem für Primatenlentiviren charakteristisch geformten kegelförmigen Nucleocapsid verpackt und von einer wirtszellstämmigen Plasmamembran umgeben sind (Abb. 2.2A).

Das 9 kb große HIV-1 Genom beinhaltet neun offene Leserahmen. Drei von ihnen codieren für die Polyproteine Gag (group specific antigen), Pol (polymerase) und Env (envelope), welche proteolytisch in die neun Proteine gespalten werden, die allen Retroviren gemein sind (Abb. 2.2A und B). Die vier Gag Proteine MA (matrix), CA/p24 (capsid), NC (nucleocapsid) und p6 sowie die beiden Env Proteine SU/gp120 (surface glycoprotein) und TM/gp41 (transmembrane glycoprotein) stellen strukturelle Komponenten des inneren Virions und der äußeren Membran dar, wohingegen die drei Pol Proteine PR (protease), RT (reverse transcriptase) und IN (integrase) enzymatische Funktionen erfüllen. Zusätzlich codiert das HIV-1 Genom für sechs spezifische Hilfsproteine, von denen Vif, Vpr und Nef im viralen Partikel enthalten sind, Tat und Rev essentielle Funktionen bei der Genregulation besitzen und Vpu die Assemblierung des Virions unterstützt. Die viralen Proteine werden von insgesamt 30 mRNA (messenger RNA)-Spezies verschiedener Längen synthetisiert, die alle vom gleichen primären Transkript stammen. Während die mRNA Moleküle der frühen, hauptsächlich regulatorischen Virusproteine Tat, Rev

und Nef in hochprozessierter Form vorliegen, werden die mRNA Moleküle der späten strukturellen und enzymatischen Virusproteine nur wenig oder überhaupt nicht umgebildet.

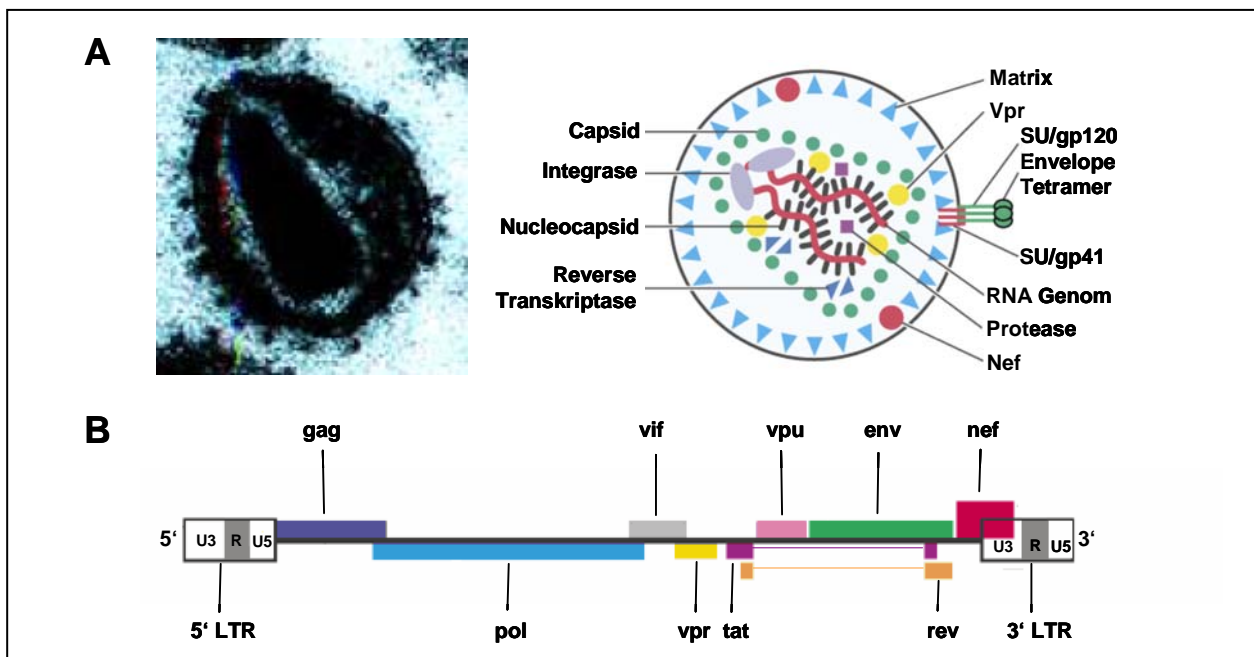


Abb. 2.2: Organisation des HIV-1 Partikels (A) und des HIV-1 Genoms (B) (nach: Greene, W. C. and Peterlin, B. M. (2002) Charting HIV's remarkable voyage through the cell. *Nat Med* 8, 673-80.).

Der Lebenszyklus von HIV-1 (Abb. 2.3) beginnt mit der Anheftung des Virions an eine Zielzelle durch Interaktion des an der Virionmembran exponierten Env Proteins SU/gp120 mit dem CD4 Rezeptor und dem CCR5 oder CXCR4 Corezeptor der Zielzellmembran [Frankel and Young, 1998; Greene and Peterlin, 2002]. Diese Interaktion bedingt eine Konformationsänderung des TM/gp41 Proteins, welche die Fusion der Virion- mit der Zielzellmembran und den Eintritt des Virionkerns in die Zielzelle unter Einfluss von Nef und Vif erlaubt. Damit gelangt der aus den Proteinen MA, RT, IN und Vpr sowie den beiden genomischen RNA Molekülen bestehende virale Nukleoproteinkomplex in das Cytoplasma, wo die reverse Transkription der positivsträngigen RNA Moleküle in lineare doppelsträngige cDNA durch die virale Reverse Transkriptase erfolgt. Anschließend wird in einem für Lentiviren charakteristischen Schritt der vollständige Präintegrationskomplex, bestehend aus den viralen Proteinen MA, RT, IN und Vpr, der proviralen cDNA und den zellulären Proteinen HMG(Y) (high mobility group) und BAF (barrier of autointegration factor) in den Nukleus transportiert. Da der Präintegrationskomplex etwa zweimal so groß ist wie die nukleäre Pore, muss dieses unter Zuhilfenahme von modulierenden Proteinen geschehen [Pemberton et al., 1998]. Als Karyophile wurden die viralen Proteine IN, MA und Vpr vorgeschlagen, die verschiedene nukleäre Lokalisationssignale zum importinabhängigen oder direkten Transport in den Zellkern tragen [Heinzinger et al., 1994; Gallay et al., 1997; Bukrinsky and Haffar, 1997; Sherman et al., 2001].

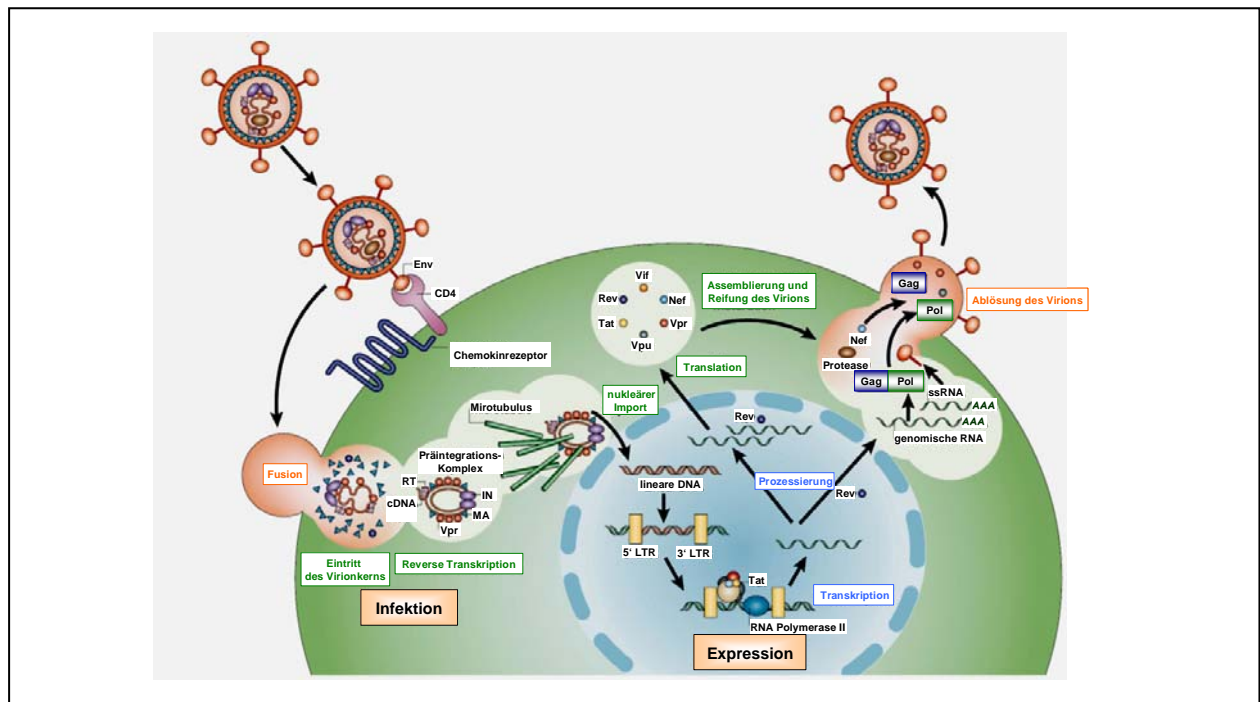


Abb. 2.3: Der Lebenszyklus von HIV-1 (nach: Peterlin, M.B. and Trono, D. (2003) Hide, shield and strike back: How HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3, 97-107.).

Im Nukleus baut die Integrase die provirale cDNA dauerhaft in das menschliche Genom ein, wobei die Integration vorzugsweise in aktiven Genen und teilweise in heterochromatinreichen Centromerregionen stattfindet [Schroder et al., 2002]. Wie im folgenden unter 2.1.4 und 2.1.5 beschrieben, führt der Einbau der cDNA in das Wirtszellgenom in Abhängigkeit von der chromosomalen Umgebung und der Anwesenheit des viralen Tat Proteins zur transkriptionellen Latenz oder Aktivität. Der zur aktiven Synthese von HIV-1 Transkripten notwendige Promotor bildet sich während der reversen Transkription durch Verknüpfung der Regionen U3 (unique 3'), R (repeat) und U5 (unique 5') zum sogenannten 5' LTR (long terminal repeat). Nach der Transkription des HIV-1 Genoms durch den zellulären Transkriptionsapparat erfolgt in der frühen Phase der Infektion die Ausschleusung der hochprozessierten mRNA Moleküle aus dem Kern, von denen im Cytoplasma die viralen Regulationsproteine einschließlich des Rev Proteins entstehen. Die Akkumulation von Rev führt daraufhin zur Ausschleusung der weniger prozessierten Transkripte und zur Entstehung der strukturellen Virusproteine, was den Beginn der virusproduzierenden Phase einleitet. Entsprechend wird in Anwesenheit von Rev die vollständige genomische RNA aus dem Zellkern exportiert und in die Nähe der Hilfsproteine Vif, Vpr und Nef sowie der Gag und Gag-Pol Polyproteine gebracht. Das Hilfsprotein Vpu löst die Env Polyproteine aus intrazellulären Komplexen mit CD4, in denen sie nach ihrer Coexpression im ER (endoplasmatisches Reticulum) vorlagen [Bour et al., 1995; Cohen et al., 1996]. Env wird zur Zelloberfläche transportiert, wo gemeinsam mit der viralen RNA der Zusammenbau von Viruspartikeln beginnt. Neben viralen Proteinen werden auch zelluläre

Komponenten wie Cyclophilin A, CD (cluster of differentiation) Proteine und MHC (major histocompatibility complex) I und II Moleküle in das Partikel eingebaut [Franke et al., 1994; Henriksson et al., 1999; Esser et al., 2001]. Das Hilfsprotein Nef reguliert an der Zelloberfläche die Endocytose und den Abbau von CD4 und verhindert so die erneute Komplexierung von Env [Mangasarian and Trono, 1997]. Durch Proteolyse von Env entstehen die Proteine SU/gp120 und TM/gp41 zum Einbau in die äußere Hülle des von der Wirtszellplasmamembran umschlossenen, unreifen Virions, welches sich in diesem Zustand von der Zelloberfläche löst. Die proteolytische Prozessierung der Gag und Gag-Pol Polyproteine durch die virale Protease führt zur morphologischen Reifung des Viruspartikels zum infektiösen Virion.

2.1.4 Das HIV-1 Tat Protein

Die Expression des integrierten HIV-1 Genoms vom proviralen 5' LTR erfolgt durch den Transkriptionsapparat der Wirtszelle und unterliegt der Regulierung durch virale und humane Transkriptionsfaktoren [Jones and Peterlin, 1994; Frankel and Young, 1998]. Als kritischer Schritt gilt dabei die transkriptionelle Elongation durch die zelluläre RNA Polymerase II, die vom viralen Tat (transactivator of transcription) Protein unterstützt wird. In der Abwesenheit von Tat binden die negativen Transkriptionsfaktoren DSIF (DRB sensitivity inducing factor) und NELF (negative elongation factor) an die elongierende RNA Polymerase II am HIV-1 Promotor und bedingen nach Synthese eines 40-60 Basen langen Transkripts einen vorzeitigen Elongationsabbruch [Yamaguchi et al., 1999; Garber and Jones, 1999]. In Anwesenheit von Tat dagegen nimmt die Zahl an vollständigen HIV-1 Transkripten um ein Vielfaches zu [Cullen, 1998].

Tat ist ein kleines hochkonserviertes Protein, das von zwei separaten Exons im HIV-1 Genom codiert wird (Abb. 2.2B). Die ersten 72 der insgesamt 101 Aminosäuren von Tat sind ausreichend für dessen transkriptionelle Aktivität und können in fünf funktionelle Regionen unterteilt werden (vergleiche auch Abb. 5.13): eine aminoterminal saure Region, eine Cysteinreiche Region (cysteine-rich region, CRR), eine Kernregion (Core), ein Arginin-reiches Motiv (arginine-rich motif, ARM) und eine Glutamin-reiche Region [Seigel et al., 1986; Garcia et al., 1988; Kuppaswamy et al., 1989]. Die aminoterminalen Regionen (Aminosäuren 1-48) bilden die transaktivierende Region, die mit Cofaktoren interagiert, wohingegen das ARM (Aminosäuren 48-59) das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) enthält und für die Bindung an RNA notwendig, aber nicht ausreichend ist [Wei et al., 1998; Zhou et al., 1998; Cullen, 1998]. Bisher existiert keine Kristallstruktur von Tat, aber NMR (nuclear magnetic resonance)-spektroskopische Daten

weisen darauf hin, dass es eine hochflexible Struktur ohne klar ausgebildete Sekundärstrukturelemente besitzt [Bayer et al., 1995].

Funktionell wirkt Tat als Adaptor für eine Vielzahl von zellulären Faktoren und Cofaktoren (Tab. 2.1), die für die Synthese von HIV-1 Transkripten durch den zellulären Transkriptionsapparat erforderlich sind.

Cofaktor	Funktion
Cap [Chiu et al., 2001]	· RNA Synthese
CDK7 (TF _{II} H) [Cujec et al., 1997]	· DNA Reparatur
	· Transkription
CTIP2 [Rohr et al., 2003]	· Nukleärer Rezeptor
Cyclin T1/CDK9 (pTEFb) [Yang et al., 1997]	· Transkriptionelle Elongation
EF-1Δ [Xiao et al., 1998a]	· Translation
Gcn5 [Col et al., 2001]	· Transkription
	· Acetyltransferase
GLI-2 [Browning et al., 2001]	· TATA-Box abhängiges Zinkfinger-Protein
	· Transkription
HT2A [Fridell et al., 1995]	· Zinkfinger-Protein der Ringfinger-Familie
p300/CBP [Hottiger and Nabel, 1998]	· Transkription
	· Acetyltransferase
p49 (NFκB) [Liu et al., 1992]	· Transkription
p65 (NFκB) [Liu et al., 1992]	· Transkription
PC4 [Holloway et al., 2000]	· Transkription
pCAF [Benkirane et al., 1998]	· Transkription
	· Acetyltransferase
pRb2/p130 [de Falco et al., 2003]	· Oncosuppressive Genregulation
RNA Polymerase II [Jones et al., 1988]	· Transkription
SP1	· Transkription
TAF _{II} 250 (TF _{II} D) [Weissman et al., 1998]	· Transkription
	· Acetyltransferase
TAF _{II} 55 (TF _{II} D) [Chiang et al., 1995]	· Transkription
TAP [Yu et al., 1995]	· Transkription
Tat-SF1 [Zhou and Sharp, 1996]	· Transkription
TBP1 [Nelbock et al., 1990]	· Transkription
TIP110 [Liu et al., 2002]	· Fetales Gehirnprotein
TIP30 [Xiao et al., 1998b]	· Kinase
Tip60 [Kamine et al., 1996]	· Transkription
	· Acetyltransferase

Tab. 2.1: Interaktionspartner des HIV-1 Tat Proteins.

Unter anderem rekrutiert Tat den positiven Elongationsfaktorkomplex pTEFb (positive-acting transcription elongation factor) an das TAR (transactivation responsive) RNA Element, welches sich spontan am 5' Ende aller viralen Transkripte bildet und die Nukleotide +1 bis +59 umfasst [Wei et al., 1998; Garber and Jones, 1999]. Der pTEFb-Komplex ist ein Multiproteinkomplex, der unter anderem den transkriptionellen Cofaktor Cyclin T1 und die Kinase CDK9 (cyclin dependent kinase) beinhaltet. Die Tat bedingte Rekrutierung von pTEFb zur TAR RNA beruht auf der kooperativen Ausbildung eines Tertiärkomplexes mit wechselseitiger Interaktion, wobei Tat mit seinem ARM (Aminosäuren 45-58) an die sogenannte Bulge-Region der TAR RNA (Nukleotide 22-24) und mit seiner transaktivierenden Domäne (Aminosäuren 1-48) an Cyclin T1 bindet. Cyclin T1 bindet seinerseits an die sogenannte Loop-Region der TAR RNA (Nukleotide

29-34) und an die Kinase CDK9 [Long and Crothers, 1995; Wei et al., 1998]. Damit gelangt CDK9 in die Nähe der großen Untereinheit der RNA Polymerase II und phosphoryliert dort die Serinreste 2 und 5 der carboxyterminalen Domäne (CTD) [Herrmann and Rice, 1995; Dahmus, 1995; Zhou et al., 2000]. Da die negativen Transkriptionsfaktoren DSIF und NELF ausschließlich an die unmodifizierte Form der RNA Polymerase II binden können, entgeht das elongierende Enzym so der inhibierenden Blockierung durch diese Proteine und kann mit hoher Prozessivität vollständige HIV-1 Transkripte synthetisieren.

Neben der TAR-vermittelten Transaktivierung bedingt Tat auch eine TAR-unabhängige Stimulierung der HIV-1 Transkription, für die eine intakte Promotor-Region, die sogenannte Enhancer-Region im LTR, und Proteine der Rel/NF κ B-Familie (nuclear factor κ B) erforderlich sind [Demarchi et al., 1996]. In Abwesenheit von Tat werden diese Proteine durch Inhibitoren der I κ B-Familie im Cytoplasma zurückgehalten. Unter Einwirkung der durch Interferon induzierbaren Kinase (PKR) induziert Tat die Degradation von I κ B- α und fördert damit die Translokation von NF κ B zum LTR. Ähnliche Mechanismen werden auch für den Einfluss von Tat auf zelluläre Promotoren verantwortlich gemacht [Howcroft et al., 1993; Westendorp et al., 1994; Ott et al., 1997].

Die Funktion von Tat wird durch posttranslationale Modifizierungen des Proteins reguliert. So ist bekannt, dass Tat durch die Acetyltransferasen p300, pCAF und Gcn5 acetyliert und durch das Protoonkoprotein Hdm2 ubiquitinyliert wird [Ott et al., 1999; Kiernan et al., 1999; Deng et al., 2000; Deng et al., 2001; Col et al., 2001; Bres et al., 2002; Bres et al., 2003]. Während der Einfluss der Ubiquitinylierung auf die Tatfunktion noch unklar ist, sind die molekularen Mechanismen der Tat-Acetylierung intensiv erforscht worden. Im Einzelnen wurden Lysin 50 im Tat ARM als Acetylierungsstelle der Acetyltransferasen p300/CBP und Gcn5 und Lysin 28 in der Tat CRR als Ziel der Acetyltransferase-Aktivität von pCAF identifiziert. Die einzelnen Acetyltransferasen wirken in Synergie mit Tat bei der Transaktivierung der HIV-1 Transkription, und diese Synergie ist abhängig von der Konservierung der jeweiligen Acetyltransferase-Domäne und der Tat Acetylierungsstelle. An Lysin 50 acetyliertes Tat interagiert spezifisch mit der Bromodomäne von pCAF, und sowohl die Lysin 50-Acetylierung als auch die Interaktion mit pCAF sind essentiell für die transaktivierende Wirkung von Tat [Mujtaba et al., 2002; Dorr et al., 2002]. Wahrscheinlich führt die Acetylierung von Lysin 50 zur Dissoziation von Cyclin T1 aus dem Tat/TAR/Cyclin T1 Komplex und dient dem Transfer des freiwerdenden Tat Proteins zur elongierenden RNA Polymerase II [Kaehlcke et al., 2003]. Dagegen wurde die Acetylierung von Lysin 28 in der Tat CRR durch pCAF mit einer gesteigerten Interaktion von Tat mit Cyclin T1 in Verbindung gebracht, und entsprechend ist das Vorhandensein von Lysin 28 Voraussetzung für die fortschreitende HIV-1 Replikation [Bres et al., 2002a].

2.1.5 Die Chromatinstruktur in der retroviralen Transkription

Nach Integration in das humane Genom wird das HIV-1 Provirus in Chromatin verpackt, was zur präzisen Positionierung von Nukleosomen entlang der HIV-1 cDNA führt [Verdin et al., 1993; van Lint et al., 1996; Sheridan et al., 1997]. Jedes Nukleosom enthält etwa 180 DNA Basenpaare und ein inneres Proteinoktamer, das aus einem Molekül Histon H1 und jeweils zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 besteht [Luger et al., 1997]. Die DNA teilt sich in die 40 Basenpaare umfassende Linker-DNA und die 140 Basenpaare lange Kern-DNA, die in einer linkshändigen Helix das Histonoktamer zweimal umwindet. Diese strukturierte Chromatinorganisation reguliert die Zugänglichkeit der genomischen DNA für zellulären Faktoren und wird durch die posttranslationale Modifikation der Histone gesteuert [Allfrey et al., 1964; Pogo et al., 1966]. So steht die reversible Acetylierung der N-Termini der Histone, die als potentielle Interaktionsstellen mit anderen Proteinen dienen, in direktem Zusammenhang mit der transkriptionellen Aktivierung von Genen im Euchromatin [Hebbes et al., 1988]. Zusätzlich unterliegen Histone weiteren multiplen Modifikationen einschließlich der Methylierung und Phosphorylierung von spezifischen Arginin-, Lysin-, Histidin-, Serin- und Threoninresten [Wolffe and Haye, 1999]. Da diese Modifikationen die positive Ladung der Histone beeinträchtigen, wurde lange angenommen, dass die kontrollierte Genexpression allein auf der Lockerung der Chromatinstruktur durch geschwächte Histon-DNA oder Histon-Histon Interaktionen beruht [Roth et al., 1992; Brownell and Allis, 1996; Hansen et al., 1998; Wolffe et al., 1999]. Die bemerkenswerte Divergenz und biologische Spezifität der verschiedenen Modifizierungsmuster von Histonen weisen jedoch darauf hin, dass die Modifikationen in kombinatorischer oder sequentieller Weise zusammenarbeiten [Strahl and Allis, 2000]. Der zugrundeliegende sogenannte Histon-Code kann jeweils nur von bestimmten Proteinen gelesen werden und bedingt damit eine spezifische Antwort. Die biologische Relevanz eines solchen Codes liegt in der sukzessiven Rekrutierung transkriptioneller Cofaktoren [Agalioti et al., 2002]. So kann die Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung der N-Termini von Histonen die Zusammenführung von Faktoren bewirken, die nicht nur indirekt durch Öffnung der Chromatinstruktur, sondern auch direkt durch Stimulierung des Transkriptionsapparates auf die Genexpression aktivierend wirken.

Im Rahmen der HIV-1 Transkription korreliert besonders die Anwesenheit des Nukleosoms nuc-1 in der Nähe der Transkriptionsstartstelle mit der transkriptionellen Inaktivität des HIV-1 Promotors. nuc-1 umfasst die Nukleotide -3 bis +141 und wird in Gegenwart von Tat entscheidend aufgelockert, so dass die nuc-1 assoziierten DNA Regionen für den Transkriptionsapparat zugänglich werden. Diese Tat-induzierte Umstrukturierung des

Chromatins wird durch die Hyperacetylierung der enthaltenen Histone gefördert, wie durch die Beobachtung, dass Inhibitoren der Histondeacetylierung *nuc-1* remodellieren und die HIV-1 Transkription aktivieren, bewiesen wurde. Tat selbst interagiert mit Acetyltransferasen wie p300/CBP, pCAF, Gcn5, TAF_{II}250 und Tip60, die spezifische Lysinreste in den N-Termini von Histonen acetylieren [Kamine et al., 1996; Marzio et al., 1998; Hottiger and Nabel, 1998; Benkirane et al., 1998; Weissman et al., 1998; Col et al., 2001]. Bis heute herrscht jedoch Unklarheit darüber, welche Domänen in Tat und den entsprechenden Acetyltransferasen für diese Interaktionen verantwortlich sind. So wurde einerseits berichtet, dass Tat mit Teilen seiner Kernregion und des ARMs an die Acetyltransferase-Domäne (Aminosäuren 1542-1710) von p300/CBP bindet [Marzio et al., 1998; Hottiger and Nabel, 1998]. Andererseits wurde gezeigt, dass Teile der Tat CRR und Kernregion mit dem N-Terminus (Aminosäuren 1-670) von p300/CBP interagieren [Benkirane et al., 1998]. Auch für eine Assoziation des N-Terminus von Tat mit der inneren KIX-Domäne (Aminosäuren 589-679) von p300/CBP konnten Hinweise gefunden werden [Vendel and Lumb, 2003].

2.2 Die Acetylierung von Proteinen durch Acetyltransferasen

Acetyltransferasen übertragen Acetylgruppen von Acetyl Coenzym A (AcCoA) entweder auf die α -Aminogruppe des aminoterminalen Restes eines Proteins oder auf die ϵ -Aminogruppe von internen Lysinresten. Die irreversible aminoterminal Acetylierung von Proteinen durch N-Acetyltransferasen (NATs) ist die häufigste posttranslationale Modifikation in Eukaryoten, aber selten in Prokaryoten, und ihre biologische Relevanz hängt stark vom jeweiligen Kontext ab [Polevoda and Sherman, 2002]. Die reversible Lysin-Acetylierung durch Histon oder Faktor Acetyltransferasen (HATs, FATs) ist hauptsächlich für Histone, seit kurzem aber auch für eine Vielzahl unterschiedlicher Nicht-Histon Proteine bekannt, darunter Chromatin-assoziierte Proteine, transkriptionelle Aktivatoren und Coaktivatoren, nukleäre Rezeptoraktivatoren und Importfaktoren, basale Transkriptionsfaktoren und Tubuline. Entsprechend wurde vermutet, dass die Lysin-Acetylierung der Kontrolle der DNA Bindung, Proteininteraktion, Lokalisation und Stabilität von Proteinen sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma dient. Tatsächlich werden eine ganze Reihe von zellulären Funktionen durch die reversible Acetylierung und Deacetylierung von Proteinen beeinflusst, einschliesslich der Transkription, der Replikation, des Zellzyklus, der Chromatindynamik, der Apoptose, des nukleären Imports, der Mikrotubulifunktion und der Hormonantwort [Sternier and Berger, 2000; Polevoda and Sherman, 2002], und es ist anzunehmen, dass sich dieses Spektrum in Zukunft noch erheblich erweitern wird.

2.2.1 Die Klassifizierung von Acetyltransferasen

Bis heute wurden mehr als 20 Proteine mit intrinsischer Acetyltransferase-Aktivität identifiziert und aufgrund von Sequenzhomologien in sechs Acetyltransferasefamilien unterteilt (Tab.2.2) [Sternier and Berger, 2000; Kuo and Allis, 1998].

Acetyltransferase	Organismus	Transkriptionelle Funktion
<u>GNAT</u>		
·Gcn5	Hefe bis Mensch	Coaktivator
·pCAF	Maus, Mensch	Coaktivator
·HAT1	Hefe bis Mensch	unbekannt
·Elp3	Hefe	Elongation
·Hpa2	Hefe	unbekannt
<u>MYST</u>		
·MOZ	Mensch	Chromosomale Translokation (AML)
·Ybf2/Sas3	Hefe	Genstilllegung
·Sas2	Hefe	Genstilllegung
·Tip60	Mensch	Proteininteraktion (HIV)
·Esa1	Hefe	Zellzyklus-Progression
·MOF	Fruchtfliege	Expression X-chromosomaler Gene
·HBO1	Mensch	Genstilllegung und Proteininteraktion
·MORF	Mensch	unbekannt
·p300	Vielzeller	Coaktivator
·CBP	Vielzeller	Coaktivator
<u>Nukleäre Hormonrezeptoren</u>		
·SRC-1	Maus, Mensch	Hormonantwort
·ACTR	Maus, Mensch	Hormonantwort
·TIF2	Maus, Mensch	Hormonantwort
·TAF _{II} 250	Hefe bis Mensch	Initiation (RNA Polymerase II)
<u>TF_{III}C</u>		
·TF _{III} C220	Mensch	Initiation (RNA Polymerase III)
·TF _{III} C110	Mensch	Initiation (RNA Polymerase III)
·TF _{III} C90	Mensch	Initiation (RNA Polymerase III)

Tab. 2.2: Familien von Acetyltransferasen.

Die GNAT (Gcn5-related N-Acetyltransferase) Superfamilie umfasst neben Gcn5 und dem stark homologen pCAF die Proteine HAT1, Elp3 und Hpa2, die alle als transkriptionelle Coaktivatoren dienen. Strukturell basiert die Verwandtschaft dieser Proteine auf der Konservierung der vier Sequenzmotive C, D, A und B [Neuwald and Landsman, 1997] und der Existenz einer Bromodomäne [Tamkun et al., 1992; Haynes et al., 1992]. Bromodomänen sind charakteristische Motive für Histon-assoziierte Proteine und bestehen aus 110 Aminosäuren

[Jeanmougin et al., 1997; Winston and Allis, 1999], die strukturell ein Vier-Helix-Bündel bilden und in dessen hydrophober „Tasche“ spezifische Acetyl-Lysine binden [Dhalluin et al., 1999; Jacobson et al., 2000; Mujtaba et al., 2002]. Es wird vermutet, dass die Bromodomäne der GNAT Acetyltransferasen so zur Substratinteraktion beiträgt und zusätzlich der Assoziation mit bestimmten chromosomalen Bereichen oder regulatorischen Proteinen dient [Winston et al., 1999; Barlev et al., 1998; Brownell et al., 1996].

Eine weitere Gruppe von evolutionär verwandten Acetyltransferasen ist die MYST Familie, deren Name auf den Mitgliedern MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 und Tip60 beruht und die zusätzlich die Proteine Esal, MOF, HBO1 und MORF umfasst. Alle Mitglieder zeigen auffallende Sequenzhomologien untereinander und besitzen eine Acetyltransferase Homologieregion, die strukturell einem Teil des A-Motivs der GNAT Superfamilie ähnelt [Neuwald and Landsman, 1997]. Einige MYST Familienmitglieder enthalten zusätzlich eine Chromodomäne an ihrem N-Terminus, die als RNA bindendes Modul dient und in einer Klasse von Histon Methyltransferasen für die spezifische Interaktion mit Lysinen verantwortlich ist [Akhtar et al., 2000; Tajul-Arifin et al., 2003]. Obwohl von MYST Acetyltransferasen in mehreren Organismen eine Vielzahl von regulatorischen Funktionen bekannt ist, liegen bisher wenige strukturelle und mechanistische Details vor.

Als eine der vielseitigsten und potentesten Acetyltransferasen gilt p300 zusammen mit seinem Homolog CBP (CREB-binding Protein), die beide als globale Coaktivatoren der eukaryotischen Transkription fungieren [Ogryzko et al., 1996; Bannister and Kouzarides, 1996] und in verschiedensten zellulären Prozessen eine Rolle spielen [Giordano and Avantaggiati, 1999]. Trotz vorhandener Sequenzübereinstimmung mit den GNAT Motiven A, B und D und dem Vorhandensein einer Bromodomäne [Haynes et al., 1992; Jeanmougin et al., 1997] repräsentiert p300/CBP eine eigene Gruppe von Acetyltransferasen [Martinez-Balbas et al., 1998].

Die nukleären Hormonrezeptor Coaktivatoren SRC-1, ACTR und TIF2 bilden eine weitere Familie von Acetyltransferasen, die erst nach Ligandenbindung an nukleäre Rezeptoren die Transkription von Genen beeinflusst. Sie zeigen signifikante Homologien in mehreren Regionen einschließlich der aminoterminalen basischen Helix-Loop-Helix/PAS Region [Taylor and Zhulin, 1999; Crews and Fan, 1999], der Rezeptor- und Coaktivator-Interaktionsdomänen und der carboxyterminalen Acetyltransferase-Domäne [Chen et al., 1997; Voegel et al., 1996].

Die TAF_{II} (TBP-associated factor)- Untereinheit des basalen Transkriptionsfaktors TF_{II}D besitzt ebenfalls intrinsische Acetyltransferaseaktivität, wobei die katalytische Kraft gegenüber den Mitgliedern der GNAT Superfamilie und p300/CBP deutlich geringer ist [Korzus et al., 1998; Ogryzko et al., 1998]. TF_{II}D ist der erste zum Aufbau des transkriptionellen RNA Polymerase II haltigen Präinitiationskomplexes benötigte Faktor und bindet die spezifischen

Promotorsequenzen der DNA [Burley and Roeder, 1996; Hampsey, 1998]. Die Acetyltransferase-Domäne des humanen TAF_{II}250 wurde in der konservierten zentralen Region des Proteins gefunden. Sie beinhaltet eine potentielle AcCoA bindende Region, aber zeigt keine sequentiellen Homologien mit anderen Acetyltransferasen [Dunphy et al., 2000]. Zusätzlich enthält TAF_{II}250 zwei Kinasedomänen und eine Bromodomäne, die jedoch anders als in den GNATs und in p300/CBP für die Acetyltransferase-Aktivität nicht essentiell ist [Mizzen et al., 1996]. Die genaue biologische Rolle der Acetylierung von Proteinen durch TAF_{II}250 und der detaillierte Mechanismus der Katalyse sind bisher ungeklärt. Ebenso unklar ist die Bedeutung der Acetyltransferase-Aktivität von TF_{III}C, eines zur Synthese von tRNA Vorstufen durch die RNA Polymerase III benötigten Transkriptionsfaktors [Kundu et al., 1999; Hsieh et al., 1999]. Da TF_{III}C jedoch wie TAF_{II}250 die Bildung des Transkriptions-Initiationskomplexes durch Bindung an die Promotor DNA fördert, ist zu vermuten, dass die Funktionen von TAF_{II}250 und TF_{III}C bei der Transkription durch die RNA Polymerasen II und III ähnlich sind.

In Zellen sind alle bisher charakterisierten Acetyltransferasen Teile von großen Multiproteinkomplexen, die ihre katalytische Aktivität modulieren [Kuo and Allis, 1998; Sterner and Berger, 2000]. So ist Gcn5 in *Saccharomyces cerevisiae* Teil der Komplexe Ada und SAGA [Grant and Berger, 1997] und pCAF Teil eines SAGA-ähnlichen Komplexes [Ogryzko et al., 1998]. In der MYST Familie bilden Esa1 und Sas3 die katalytischen Untereinheiten des Histon H4-spezifischen NuA4-Komplexes [Allard et al., 1999] und des Histon H3-spezifischen NuA3-Komplexes [John et al., 2000].

Da im Rahmen dieser Arbeit die Acetyltransferasen p300/CBP und pCAF eingesetzt wurden, erfolgt nachstehend unter 2.2.2 und 2.2.3 eine Erläuterung ihrer funktionellen und mechanistischen Details.

2.2.2. Die Acetyltransferase p300/CBP

Die Acetyltransferasen p300 und CBP sind große Proteine von jeweils etwa 300 kDa. Das 2414 Aminosäuren umfassende p300 Protein wurde in Assoziation mit dem adenoviralen E1A Onkoprotein identifiziert [Whyte et al., 1989] und bedingt eine Reihe von E1A Effekten wie der Modulation der Expression von Wirtszellgenen, der Inhibierung der Zelldifferenzierung und der Förderung der Zellzyklusprogression [Moran, 1993; Eckner et al., 1994;]. p300 zeigt eine Sequenzhomologie von 91% mit dem 2441 Aminosäuren langen CREB-bindenden Protein CBP [Arany et al., 1994], das spezifisch mit der phosphorylierten Form des cAMP-response element-binding (CREB) Proteins interagiert [Chrivia et al., 1993].

Die Sequenzorganisation von p300- und CBP- Isolaten aus Drosophila, Nematoden und Vertebraten ist erstaunlich ähnlich und umfasst mehrere funktionelle Proteindomänen (Abb. 2.4A).

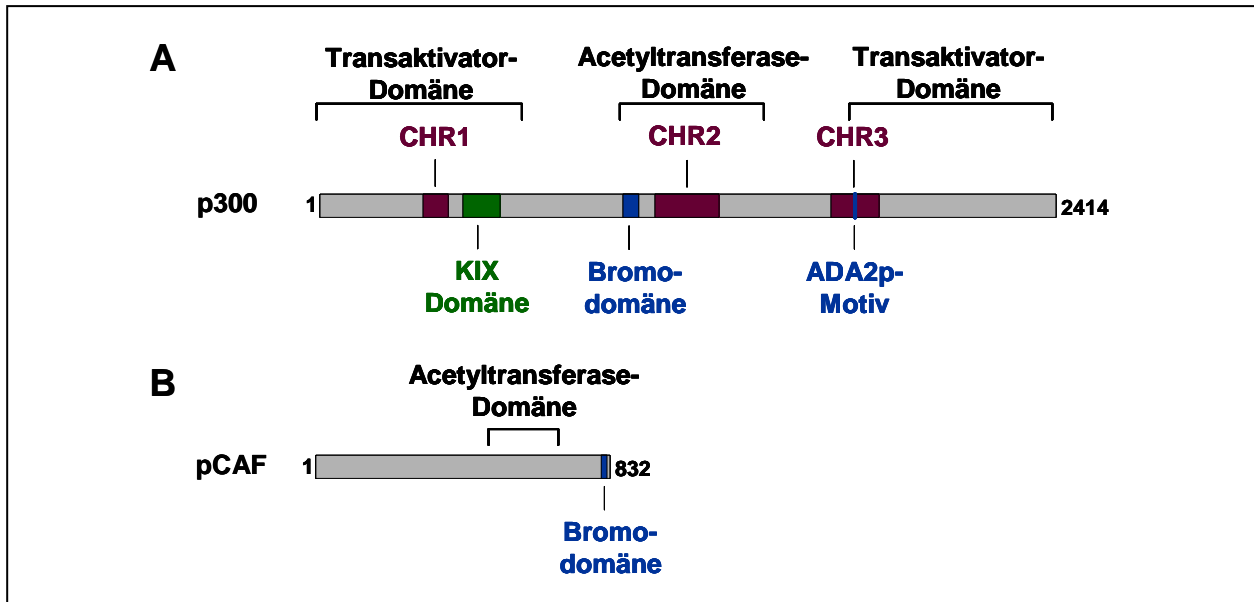


Abb. 2.4: Die funktionellen Proteindomänen der Acetyltransferasen p300 (A) und pCAF (B).

Die drei enthaltenen Cystein-Histidin-reichen (CH)- Regionen vermitteln Protein-Protein Interaktionen mit verschiedenen Gruppen von Cofaktoren und Aktivatoren. Eine dieser CH-Regionen, die CHR 2, liegt eingebettet in der zentralen Domäne des Proteins, welche eine intrinsische Acetyltransferase-Aktivität aufweist und eine Bromodomäne enthält, deren genaue Rolle bei der Funktion der beiden Acetyltransferasen noch ungeklärt ist [Ogryzko et al., 1996]. Zusätzlich enthalten der C- und der N-Terminus von p300 und CBP jeweils eine starke Transaktivator-domäne, die in ihrer Funktion von der Acetyltransferase-Domäne unabhängig sind [Yuan et al., 1996]. Es wird vermutet, dass die Transaktivator-domänen in Kombination mit anderen Domänen in p300 und CBP als Gerüst zur Bindung von Transkriptionsfaktoren und basalen Komponenten des Transkriptionsapparates dienen [Giordano et al., 1999]. Weiterhin besitzen p300 und CBP ein sogenanntes ADA2-ähnliches Motiv, das Homologie mit dem transkriptionellen Coaktivator ADA2p zeigt, sowie eine KIX (KID-interacting)- Domäne.

Die Acetyltransferase-Region der p300 und CBP Acetyltransferasen ist *in vitro* ausreichend für die Acetylierung von Lysinresten in spezifischen Substraten, darunter die vier Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 [Ogryzko et al., 1996; Bannister and Kouzarides, 1996; Schiltz et al., 1999; Gu and Roeder, 1997]. *In vivo* ist die Spezifität der Acetylierung abhängig vom nukleosomalen Kontext und beschränkt sich auf die Lysine 5 und 8 im N-Terminus von Histon H4 und in geringerem Maße auch auf die Lysine 8 und 14 von Histon H3. Zusätzlich wurde in den letzten

Jahren eine Vielzahl von Nicht-Histon Proteinen als Substrate von p300 und CBP identifiziert (Anhang 7.4).

p300 und CBP besitzen gegenüber der GNAT Superfamilie eine stark erweiterte Substratspezifität, aber die molekularen Determinanten ihrer Substratauswahl oder eine Konsensussequenz der Acetylierungsstelle sind bisher nicht bekannt. Mechanistische Studien an synthetischen Histonpeptiden und der Vergleich von Nicht-Histon Substraten weisen jedoch darauf hin, dass es bei der Substraterkennung oder Katalyse durch p300 und CBP eine Präferenz für einen positiv geladenen oder in geringerem Maße auch für einen hydrogenbindenden Rest in Position Lys-3 oder Lys+4 von der Acetylierungsstelle gibt [Thompson et al., 2001]. Andernfalls können positiv geladene Reste in Position Lys+2 oder Lys+3 als Substitution für Position Lys+4 und Lys-3 dienen, wobei diese Substrate möglicherweise mit geringerer Effizienz acetyliert werden. Eine weitere Voraussetzung für die Acetylierung durch p300 und CBP ist die Struktur der Lysinseitenkette. Interessanterweise zeigen p300 und CBP auch dabei eine gewisse Toleranz, da sie *in vitro* neben den proteinogenen L-Lysinen auch D-Lysine acetylieren, wohingegen sich die Acetyltransferase-Aktivität anderer Acetyltransferasen auf L-Lysine beschränkt [Thompson et al., 2001].

Als bestimmend für die katalytische Umsatzrate von p300 und CBP erwies sich ein diffusionskontrollierter Schritt, der wahrscheinlich das acetylierte Substrat nach stattgefundener Katalyse betrifft. Somit gewinnen mögliche allosterische Aktivatoren oder posttranslationale Modifikationen von p300 und CBP an Bedeutung, da sie die Enzymwirkung verstärken können, indem sie die Produktfreisetzung vereinfachen [Lau et al., 2000a]. Der katalytische Mechanismus von p300 und CBP beruht vermutlich auf einem sequentiellen „Ping-Pong“-Mechanismus und führt über ein bisher nicht identifiziertes Enzymintermediat, in dem p300 und CBP die Acetylgruppe von AcCoA übernehmen, kovalent mittels eines reaktiven Aminosäurerests gebunden halten und anschließend an das Substrat weitergeben [Thompson et al., 2001; Lau et al., 2000b]. Da hierbei AcCoA und das Substrat nacheinander und nicht gleichzeitig an die Acetyltransferase binden, ist bei p300 und CBP wie oben erwähnt eine weitgestreute Substratauswahl möglich.

p300 und CBP dienen als globale Regulatoren der Transkription, indem sie eine Integrationsebene für verschiedene Signale bilden und zur Verknüpfung unterschiedlicher Genexpressionsmuster in Reaktion auf externe Reize beitragen. Nach Überexpression in immortalisierten Zellen wurde gezeigt, dass p300 und CBP mit den gleichen intrazellulären Proteinen interagieren, die gleichen Gene aktivieren und an den gleichen biologischen Prozessen teilnehmen können. Im physiologischen Kontext jedoch kontrollieren p300 und CBP die Expression verschiedener Gene, und ihre Funktionen überlappen nur teilweise [Kawasaki et al.,

1998; Yao et al., 1998]. Im Zellzyklus erreicht die Acetyltransferase-Aktivität beider Enzyme das Maximum beim Übergang von der G1- zur S-Phase [Ait-Si-Ali et al., 1998]. Obwohl p300 und CBP in die gleichen biologischen Prozesse involviert sind, konnten bis heute keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die beiden Acetyltransferasen in Multiproteinkomplexen coexistieren oder auf andere Weise direkt oder indirekt interagieren [Giordano and Avantaggiati, 1999].

p300 und CBP können auf verschiedene Arten zur Aktivierung der Transkription beitragen [Lundblad et al., 1995; Chan and La Thangue, 2001; Manning et al., 2001]. Erstens binden sie als Brückenproteine verschiedene sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren und -aktivatoren und kontrollieren ihre signalabhängige Rekrutierung zum Transkriptionsapparat. Folglich sind sie in einer Vielzahl von intrazellulären Komplexen zu finden [Eckner, 1996; Janknecht and Hunter, 1996; Tsukiyama and Wu, 1997; Giles et al., 1998]. Zweitens fungieren sie als Gerüstprotein für multiple Kontakte mit der basalen Transkriptionsmaschinerie, um die Formation des stabilen Präinitiationskomplexes zu erleichtern. Unter anderem konnten direkte Interaktionen mit TBP, TF_{II}B, TF_{II}D, der RNA Helikase und der RNA Polymerase II gezeigt werden [Imhof et al., 1997; Nakajima et al., 1997; Kee et al., 1996]. Drittens acetylieren sie spezifische Lysinreste von nukleosomalen Histonen in der Nähe des Promotors bestimmter Gene und vereinfachen damit den Zugang für das RNA Polymerase II Holoenzym [Ogryzko et al., 1996; Bannister and Kouzarides, 1996]. Viertens acetylieren sie zusätzliche basale und spezifische Cofaktoren und Chromatin-assoziierte Proteine und modulieren dadurch deren DNA-Protein- und Protein-Protein Interaktionen (vergleiche Anhang 7.4).

Viele, wenn auch nicht alle biologischen Funktionen von p300 und CBP beruhen auf ihrer intrinsischen Acetyltransferase-Aktivität. Diese wird durch posttranslationale Modifikationen wie der zellzyklusabhängigen Phosphorylierung und der Autoacetylierung reguliert [Yaciuk and Moran, 1991; Janknecht and Hunter, 1996; Kumar et al., 2001; Yuan et al., 2002]. Zusätzlich können Bindungspartner von p300 und CBP, einschließlich des HIV-1 Tat Proteins und des viralen Onkoproteins E1A, die Acetyltransferase-Aktivität direkt beeinflussen. [Ait-Si-Ali et al., 1998; Giordano and Avantaggiati, 1999]. Hervorzuheben ist, dass eine Vielzahl biologischer Effekte von p300 und CBP auf der Assoziation mit pCAF basieren, welche durch virale Proteine, die ebenfalls an p300 und CBP binden, aufgehoben werden kann [Scolnick et al., 1997; Liu et al., 1999]. Grundsätzlich sind somit sowohl die Dissoziation von pCAF als auch die direkte Inhibierung der Acetyltransferase-Aktivität als Schlüsselpunkte der Modulation der biologischen Funktionen von p300 und CBP anzusehen.

2.2.3 Die Acetyltransferase pCAF

Das 90 kDa große Protein pCAF umfasst 832 Aminosäuren und wurde ursprünglich als p300/CBP-assoziierter Faktor identifiziert, der mit dem adenoviralen E1A Onkoprotein um die Bindung mit p300/CBP konkurriert [Yang et al., 1996]. Die pCAF Sequenz weist eine Homologie von 70% mit dem humanen Homolog der Gcn5 Acetyltransferase aus *Saccharomyces cerevisiae* auf [Candau et al., 1996; Yang et al., 1996], und die zellulären Funktionen von pCAF und Gcn5 überlappen [Yamauchi et al., 2000]. Die funktionellen Domänen von pCAF (Abb. 2.4B) schließen die zentrale Acetyltransferasedomäne, eine carboxyterminale Bromodomäne, welche die Interaktion mit acetylierten Histonen und acetyliertem HIV-1 vermittelt [Dhalluin et al., 1999; Dorr et al., 2002], und eine aminoterminal Interaktionsregion für das Adenovirus E1A Onkoprotein, für p300/CBP und für eine Reihe transkriptioneller Aktivatoren wie ADA2p und nukleäre Rezeptoren ein [Yang et al., 1996; Krumm et al., 1998; Blanco et al., 1998; Chakravarti et al., 1999]. Der N-Terminus ist für die transkriptionelle Aktivierung bestimmter Gene essentiell, da diese Region von pCAF in großen Multiproteinkomplexen mit p300/CBP interagiert und ihre simultane Rekrutierung zum Promotor eine notwendige Voraussetzung für die nukleosomale Histonacetylierung ist [Chen et al., 1997]. Daneben existiert ein zusätzlicher pCAF-Coaktivierungskomplex unter Ausschluss von p300/CBP, der mehrere histonartige Untereinheiten enthält und eine auffallende Histon-Oktamerstruktur ohne flexible N-Termini einnimmt [Ogryzko et al., 1998]. Möglicherweise übernimmt dieser p300/CBP-freie pCAF-Komplex eine architektonische Rolle bei der Aufrechterhaltung der aktivierten Chromatinstruktur.

pCAF und p300/CBP können sowohl in Synergie als auch unabhängig voneinander die Transkription von Genen aktivieren. Beide Enzyme acetylieren *in vitro* und *in vivo* die N-Termini der Histone H3 und H4 sowie eine Reihe von Nicht-Histon Proteinen, und ihre Acetyltransferaseaktivitäten werden durch das Adenovirus E1A Onkoprotein reguliert [Sternier and Berger, 2000]. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Spezifität für bestimmte Lysinreste, und die Gesamtanzahl der bekannten Substrate von pCAF bleibt deutlich hinter der von p300/CBP zurück. pCAF acetyliert *in vitro* Lysin 14 in Histon H3 und Lysin 8 in Histon H4, wohingegen p300/CBP zusätzlich Lysin 14 und 18 in Histon H3 und Lysin 5 und 8 in Histon H4 acetylieren kann [Sternier and Berger, 2000]. Der Schlüssel für die Erkennung und Auswahl von Substratlysinen in Peptiden liegt bei pCAF hauptsächlich in der katalytischen Domäne. Allerdings nehmen auch die anderen funktionellen Domänen Einfluss, was auf eine komplexe Regulierung der Substratbindung im physiologischen Kontext hinweist [Lau et al., 2000b].

pCAF gehört zur GNAT Superfamilie, deren Acetyltransferase-Domänen strukturell in eine aminoternale und eine carboxyterminale Unterdomäne unterteilt ist, die durch eine tiefe Spalte voneinander getrennt sind [Dutnall et al., 1998]. Das AcCoA Molekül bindet an die GNAT charakteristischen A und D Motive in dieser Spalte und wird durch das B Motiv in der carboxyterminalen Domäne in einer geknickten Position gehalten [Modis and Wierenga, 1998]. Die Bindung eines AcCoA Moleküls erleichtert die gleichzeitige Interaktion des Substratproteins mit der erweiterten Spalte und bringt dabei die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes in die Nähe des Acetylgruppendonors [Marmorstein, 2001]. Eine Katalyse durch pCAF erfordert somit die Bildung des ternären Komplexes aus Enzym, Substrat und AcCoA und beruht auf der Deprotonierung des Lysinsubstrates [Tanner et al., 1999] oder einem direkten nukleophilen Angriff zwischen Substrat und AcCoA [Dutnall et al., 1998]. Im Gegensatz zum „Ping-Pong“-Mechanismus von p300/CBP liegt der Katalyse durch pCAF somit ein geordneter Ternärkomplex-Mechanismus zugrunde, und der limitierende Faktor der katalytischen Umsatzrate ist hierbei ein chemischer Schritt, möglicherweise die Substratfreisetzung nach der Katalyse und die damit in Zusammenhang stehende Konformationsänderung [Lau et al., 2000b]. Interessanterweise adaptiert das MYST Familienmitglied Esa1 im Komplex mit AcCoA trotz der geringen Sequenzhomologie dieselbe Gesamtfaltung wie pCAF [Yan et al., 2000], unterliegt aber einem „Ping-Pong“-Katalysemechanismus unter Einbeziehung eines Acetyl-Enzym-Intermediates [Yan et al., 2002].

Kürzlich wurde berichtet, dass pCAF *in vivo* durch Autokatalyse in seinem N-Terminus und durch p300, nicht aber durch CBP in seinem C-Terminus acetyliert wird [Santos-Rosa et al., 2003]. Die Acetylierung von pCAF steigert seine Proteinstabilität und Acetyltransferaseaktivität, hat aber keinen Einfluss auf seine Substratspezifität. Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass eine Acetyltransferase durch direkte Acetylierung die Aktivität einer zweiten Acetyltransferase zu modifizieren vermag. Diese Beobachtung bekräftigt die Annahme, dass Acetyltransferasen ähnlich wie Kinasen in direkten Signaltransduktionskaskaden wirken können [Kouzarides, 2000].

2.3 Die Analyse der Proteinacetylierung

Die posttranslationale Modifizierung von Proteinen durch Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Glykosylierung, Acylierung, Ubiquitinylierung, SUMOylierung oder ADP-Ribosylierung erhöht die Zahl der durch die 20 proteinogenen Aminosäuren möglichen molekularen Strukturen und bietet eine zusätzliche Signalebene für die Kontrolle und Steuerung von Proteinfunktionen. Obwohl die reversible Phosphorylierung noch immer als wichtigster

regulatorischer Mechanismus in zellulären Signalkaskaden gilt, ist das Verständnis der co- und posttranslationalen Acetylierung als biologisch relevante Modifizierung in den letzten Jahren gewachsen. Besonders die unter 2.2 geschilderte zunehmende Identifizierung von Nicht-Histon Substraten von Acetyltransferasen und die anerkannte Reversibilität der Acetylierung durch Deacetylasen [Pandey et al., 2002] haben wesentlich zu der Erkenntnis beigetragen, dass die spezifische Acetylierung von Lysinresten eine ebenso wichtige Rolle bei der Modulierung von Proteinaktivitäten spielen kann wie die spezifische Phosphorylierung von Serin-, Threonin-, Tyrosin- oder Histidinresten [Kouzarides, 2000].

Wie unter 2.2.1 ausgeführt, existiert eine Vielzahl von funktionell und mechanistisch unterschiedlichen Acetyltransferasen. Sie modifizieren jeweils nur spezifische Lysinreste von Proteinen, aber bisher ist wenig bekannt über die Erkennung und Auswahl dieser Reste [Marmorstein, 2001]. Das Spektrum ihrer Substrate umfasst Proteine der unterschiedlichsten Funktionen aus fast allen zellulären Kompartimenten. Die meisten von diesen Substraten wurden mit Hilfe von synthetischen Modellpeptiden durch radioaktive *in vitro* Markierung oder durch immunchemische Methoden unter Verwendung von modifikationsspezifischen Antikörpern identifiziert. Zunehmend erfolgt die Untersuchung von Lysin-Acetylierungen auch mit Hilfe der Massenspektrometrie [Lapko et al., 2001; Ugrinova et al., 2001; Lee et al., 2002; Zhang et al., 2002, Starai et al., 2002; Zhang et al., 2003], da die MALDI und ESI MS schnelle und empfindliche Methoden bei der Charakterisierung von Proteinmodifikationen darstellen.

Acetylierte Peptide zeigen im MALDI TOF Prozess eine hohe Stabilität und unterscheiden sich darin von Phosphopeptiden, die einen metastabilen Verlust von H_3PO_4 und HPO_3 erleiden [Annan et al., 1996]. Deshalb können acetylierte Peptide im Spektrum anhand der charakteristischen Massenverschiebung von + 42 Da ihrer Signale identifiziert werden, zeigen aber keine auf die Modifizierung hinweisenden Zerfälle. Dagegen wird im ESI MS/MS Prozess ein Acetyl-Lysin spezifisches Markerion mit m/z 126.1 detektiert, das zusätzlich zum korrespondierenden Immoniumion mit m/z 143.1 zur Identifizierung von acetylierten Peptiden herangezogen werden kann [Kim et al., 2002].

Durch das zunehmende Wissen über die Rolle der Acetylierung bei der Regulation von Proteinfunktionen und -interaktionen gewinnt die Analyse von acetylierten Proteinen nicht nur in der Molekularbiologie, sondern auch in der Proteomanalyse an Bedeutung. Ein Proteom wurde ursprünglich als das Proteinkomplement eines Genoms definiert [Wasinger et al., 1995] und ist aufgrund seiner Abhängigkeit von externen und internen Einflüssen äußerst komplex und dynamisch. Neben der Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Proteine eines Proteoms ist die Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen die Hauptaufgabe der Proteomanalytik, da diese nicht nur der Grund für die Detektion zahlreicher Proteinisoformen in

der hochauflösenden 2D PAGE und der multidimensionalen LC sind, sondern auch die reine Auflistung der in einer Zelle oder einem Gewebe exprimierten Proteine mit funktionellen Daten verknüpft. Bisher konzentrierte sich die proteombezogene Analyse von posttranslationalen Modifikationen auf die Phosphorylierung und in geringerem Maße auf die Glykosylierung von Proteinen. Es ist jedoch zu erwarten, dass auch hier in Zukunft der Acetylierung zunehmende Bedeutung zukommen wird, um die funktionellen Details der Variabilität und der Regulation eines Proteoms vollständig aufzudecken.

3 Zielsetzung

Während der letzten Jahre hat das Verständnis der Lysin-Acetylierung durch Acetyltransferasen als biologisch relevante posttranslationale Modifikation von Proteinen in zellulären Signalkaskaden zugenommen. Die Identifizierung von enzymatischen Acetylierungsstellen erfolgte in der Vergangenheit zumeist durch radioaktive *in vitro* Markierung oder durch immunchemische Methoden unter Verwendung von modifikationsspezifischen Antikörpern.

Ziel dieser Arbeit ist eine detaillierte Analyse der Acetylierung des HIV-1 Tat Proteins mit Hilfe der Massenspektrometrie, um den Nutzen von proteinanalytischen Methoden bei der Charakterisierung von Acetylierungsstellen in Proteinen aufzuzeigen und die molekularen Details der Tat Acetylierung zu klären.

Das HIV-1 Tat Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der transkriptionellen Aktivität des integrierten HIV-1 Provirus. In diesem Zusammenhang interagiert Tat mit einer Vielzahl zellulärer Cofaktoren, darunter die Acetyltransferasen p300/CBP, pCAF und Gcn5, und wird selbst durch p300/CBP an Lysin 50 in seinem Arginin-reichen Motiv acetyliert. Die enzymatische Acetylierung von Lysin 50 ist essentiell für die transaktivierende Wirkung von Tat während der HIV-1 Transkription.

Im Einzelnen soll in dieser Arbeit der Einfluss der Tat Sequenz auf die *in vitro* Acetylierung von Lysin 50 durch p300 in Peptiden ermittelt werden, um die für diese Modifikation kritischen benachbarten Aminosäuren zu identifizieren. Dazu stehen synthetische Tat Peptide und Proteine zur Verfügung, die *in vitro* acetyliert und mittels Massenspektrometrie analysiert werden können. Diejenigen Aminosäuren, die die Acetylierung von Lysin 50 durch p300 beeinflussen, sollen *in vivo* in Tat Expressionsvektoren mutiert werden. Unter Verwendung der hergestellten Tat Mutantenvektoren kann in Transfektionsstudien mit Hilfe von Promoter-Reporter Konstrukten der biologische Effekt der Mutationen auf die transkriptionelle Transaktivität von Tat erfasst werden. Ein Vergleich der für die Acetylierung durch p300 kritischen Aminosäuren in Tat mit anderen Substraten dieser Acetyltransferase kann weitere Hinweise auf die allgemein notwendigen Sequenzbedingungen liefern, aus denen sich möglicherweise eine Konsensussequenz für eine Lysin-Acetylierung durch p300 ableiten lässt. Zusätzlich soll im Rahmen dieser Arbeit die mögliche Acetylierung von Tat durch andere Acetyltransferasen wie pCAF untersucht werden. Konzeptionell steht dabei die *in vitro* Acetylierung von synthetischen Tat Peptiden und Proteinen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse im Vordergrund.

4 Material und Methoden

4 Material

4.1 Chemikalien

30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	JT Baker, Deventer, Netherlands
AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-Benzensulfonylfluorid)	AppliChem, Darmstadt
Agarose, electrophoresis grade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
APS (Ammonium Peroxodisulfat)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DEAE (Diethylaminoethanol)-Dextran	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden
DOC (Natriumdeoxycholat)	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	GERBU, Gaiberg
EGTA (1,2-Bis-(2-Aminoethoxyethan)-Tetraacetat)	GERBU, Gaiberg
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
H ₂ O ultrapure (Wasser)	Merck Biosciences, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
NP-40 (Nonidet® P-40)	AppliChem, Darmstadt
Paraformaldehyde	Polysciences, Warrington, USA
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	GERBU, Gaiberg
β-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TFA (Trifluoressigsäure)	Perbio Science, Bonn
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt
TRIZMA Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaureat)	AppliChem, Darmstadt
α-Cyano-4-hydroxymethylsäure	Bruker-Daltonik, Bremen

4.1.2 Nukleotide, Nukleinsäuren, Aminosäuren, Peptide und Proteine

35S-Methionine	Amersham Biosciences, Freiburg
Angiotensin I	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
BenchMark Prestained Protein Ladder (kD):82.9,113.7,80.9,63.8,49.5,37.4,26.0,20.5,14.9,8.4	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
BSA Fraktion V (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
dNTPs (PCR Nucleotide Mix, 10 mM)	Promega, Mannheim
Fmoc Aminosäure Derivate	Merck Biosciences, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Oligonukleotid-Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Synthetische Peptide	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg
Rinderinsulin, B-Kette	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Synthetische Proteine	Institut für Biochemie, Charité, Berlin
TAR RNA	Xeragon, Huntsville, USA
α -35S-dATP	Amersham Biosciences, Freiburg
λ -DNA Hind III Fragmente (bp):23130,9416,6557,4361,2322,2027,564,125	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

4.1.3 Enzyme und Antikörper

Acetyl-Coenzym A	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Anti-FLAG mouse monoclonal, IgG1, clone: AC11.AE1	BabCO, Richmond, USA
Anti-HA rat monoclonal, clone: 3F10	Roche, Mannheim
Endoproteinase Lys-C	Roche, Mannheim
Mouse anti-rat-HRP	Dianova GmbH, Hamburg
pCAF Acetyltransferase Domäne	Upstate, Lake Placid, USA
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Restriktions-Endonukleasen und Puffer	New England BioLabs, Frankfurt
T7 RNA Polymerase	Promega, Mannheim

4.1.4 Zellkulturmaterialien

Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bacto™ Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
DH5α, kompetente Bakterien	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMEM + Natriumpyruvat + Pyridoxin, 1000 mg/l Glukose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxide)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
LB Agar	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
LB Broth Base	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin, 200mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
OPTIMEM 1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS, Dulbecco's, - Ca & Mg und Natriumbicarbonat	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640, mit L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypanblau in DMSO	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (1x) in HBSS, - Ca & Mg	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zelllinie 1G5	DSMZ, Braunschweig
Zelllinie Cos7	Ogden Biosciences, Rockville, USA

4.1.5 Reagentien, Lösungen und Baukästen

Amplifizierungslösung für Proteingele (Amplify)	Amersham Biosciences, Freiburg
Bio-Rad Protein Assay Solution	Bio-Rad, München
Proteinaseinhibitorencocktail, Complete, Mini, EDTA-free	Roche, Mannheim
ECL, Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Freiburg
Lipofectamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
ProSorb Probenpräparation für Edman Sequenzierung	Applied Biosystems, Foster City, USA
Protein A-Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Protran, 0.2 µm Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher & Schuell, Einbeck
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amstardam, Netherlands
Sequenase Quik-Denature Plasmid Sequencing Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
TNT Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim
Wizard Plus Minipreps DNA Purification System	Promega, Mannheim

4.1.6 Laborwaren und Geräte

BioMax Film	Amersham Biosciences, Freiburg
CK2, Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
CO ₂ -Incubator, IG 150	Jouan GmbH, Unterhaching
Edman Kapillarsequenzator cLC 494	Applied Biosystems, Foster City, USA
Gelelektrophorese- und Blottingapparatur, Mini Format	Bio-Rad, München
HPLC Pumpe Sil-8A	Shimadzu, Duisburg
HPLC Säule Kromasil	Eka Chemicals, Bohus, Sweden
Lumat LB 9501, Luminometer	Berthold, Wildbad
MALDI TOF MS, Reflex II	Bruker-Daltonik, Bremen
Neubauer improved, Hemocytometer	Superior, Lauda-Königshofen
Peptidsynthesegerät AMS 422	Abimed GmbH, Langenfeld
Phase Lock Tubes Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Sterile Sicherheitswerkbank	The Baker Company, USA
Super RX, Medizinischer Röntgenfilm	Fuji Photo Film, Düsseldorf
UltrospecII, Spektrophotometer	LKB biochrom, England
ZipTip™ Pipettenspitzen	Millipore Bedford, USA

Alle nichtgenannten Chemikalien, Substanzen und Lösungen wurden in Ultrapure- oder Analyse-Qualität von einem der folgenden Hersteller bezogen: Merck, Roth, J.T.Baker, Sigma Aldrich, AppliChem.

Alle nichtgenannten Plastikwaren und Verbrauchsmittel wurden von einem der folgenden Hersteller bezogen: Bio-Rad, BIOzym, Eppendorf, Nerbe plus, Neo Lab, Schleicher & Schuell, Whatman.

Alle nichtgenannten für die Zellkultur verwendeten Plastikmaterialien und Verbrauchsmittel wurden von einem der folgenden Hersteller bezogen: BD Falcon, Corning, Nalgene, Greiner Labortechnik, Eppendorf.

4.2 Methoden

4.2.1 Proteinanalytische Methoden

4.2.1.1 Peptid- und Proteinsynthese

Alle verwendeten Tat Peptide (Anhang 7.1) und Peptidgemische (Anhang 7.2) wurden von H.R. Rackwitz (Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg) unter Verwendung von standardisierten Fmoc-Reaktionszyklen schrittweise auf einem multiplen Peptidsynthesegerät AMS 422 (ABIMED Analysetechnik GmbH, Langenfeld) synthetisiert. Acetyl-Lysine wurden als Fmoc-Lys(ac)-OH Derivate und Acetamidomethyl (acm)- geschützte Cysteine als Fmoc-Cys(acm)-OH Derivate während der Kettenverlängerung eingebaut. Die Peptide wurden mit TFA von den Schutzgruppen befreit und vom Harzträger abgespalten, durch RP HPLC gereinigt und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie charakterisiert.

Auf die gleiche Weise wurden die verwendeten vollständigen Tat Proteine von Peter Henklein (Institut für Biochemie, Charité, Berlin) synthetisiert und mittels ESI Massenspektrometrie auf ihre Identität überprüft.

Für die folgenden biochemischen Analysen wurden alle Peptide und Proteine lyophilisiert und in Form von wässrigen 1mM Stocklösungen verwendet.

4.2.1.2 Präparative RP HPLC-Trennung der Peptidgemische

Die Trennung bei der RP HPLC beruht auf der hydrophoben Wechselwirkung einer in der organisch-wässrigen mobilen Phase gelösten Peptide mit einer unpolaren organischen stationäre Phase, die durch Veretherung der Hydroxygruppen der Trägermatrix mit Kohlenwasserstoffketten entsteht.

In dieser Arbeit erfolgte die RP HPLC Trennung der Peptidgemische für weitere Einzelanalysen mittels präparativer RP HPLC unter Verwendung einer C18 Kromasil-Säule der Dimensionen 250 x 20 mm und einer Partikelgröße von 5 µm (Eka Chemicals, Bohus, Sweden). Dazu wurden jeweils 2-3 mg des lyophilisierten Peptidgemisches in 5 ml 0,1% TFA solubilisiert und nach Äquilibration der Säule auf 0,085% TFA/8% Acetonitril injiziert. Der Gradient wurde durch den Gradientenmischer der Pumpe Shimadzu Sil-8A (Shimadzu, Duisburg) aus den Lösungsmitteln A (0,1% TFA) und B (0,085% TFA/80% Acetonitril) erzeugt und stieg in 40 min von 10% B auf 90% B. Die Flussrate betrug 10 ml/min, und die Detektion der Peptide erfolgte bei 220 nm durch Anregung der Peptidbindung. Eluierende Peptide wurden in 1 ml

Fraktionen gesammelt und mittels analytischer RP HPLC und MALDI TOF Massenspektrometrie auf ihre Reinheit überprüft. Fraktionen, die das reine Peptid enthielten, wurden vereinigt, lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.1.3 *In vitro* Acetylierung von Peptiden und Proteinen

Zur enzymatischen *in vitro* Acetylierung von synthetischen Peptiden und Proteinen wurden rekombinante Fusionsproteine, die die Acetyltransferasedomänen von p300 oder pCAF darstellen, verwendet. Die GST-markierte Acetyltransferasedomäne von p300 (Aminosäuren 1195-1810) stammte aus überexprimierenden DH5 α -Bakterien und wurde von Alexander P. Dörr (Angewandte Tumorstudiologie, DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die GST-markierte Acetyltransferasedomäne von pCAF (Aminosäuren 352-832) stammte aus überexprimierenden *Escherichia coli* Bakterien und wurde käuflich erworben (Upstate, Lake Placid, USA).

Jeweils 2 nmol synthetisches Peptid oder Protein wurden mit äquivalenten Mengen Enzym in Gegenwart von 20 nmol AcCoA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l für 30 min bei 30°C inkubiert. Der Reaktionspuffer enthielt 50 mM HEPES pH 8.0, 10% Glycerin, 1mM DTT und 10 mM Natriumbutyrate. Die Reaktion wurde durch Einfrieren bei -20°C beendet.

4.2.1.4 Endoproteinase Lys-C Verdau von Peptiden und Proteinen

Die Endoproteinase LysC hydrolysiert spezifisch die Peptidbindung auf der carboxyterminalen Seite von unmodifizierten Lysinresten. Dazu wurden jeweils 1,6 nmol synthetisches Peptid oder Protein über Nacht bei -20°C mit einer Endkonzentration von 80% Aceton aus den *in vitro* Acetylierungsansätzen präzipitiert. Nach Abnahme des Überstandes und vollständiger Lyophilisierung des Präzipitats erfolgte die Resuspendierung in 25 μ l 40 mM Ammoniumbicarbonatpuffer. Zur proteolytischen Spaltung wurde die Endoproteinase Lys-C in einem Verhältnis von 1/50 der Gewichtsmenge des Peptids bzw. des Proteins eingesetzt. Der Verdau erfolgte innerhalb einer sechsständigen Inkubation bei 37°C und wurde durch Einfrieren bei -20°C beendet.

4.2.1.5 MALDI TOF Massenspektrometrie

Peptide können durch einen gepulsten Laser zur Desorption gebracht werden, wenn man sie mit einer Matrix aus kleinen organischen Molekülen, die bei der eingestrahnten Laserwellenlänge eine hohe Absorption zeigen, kokristallisiert. Die Matrixmoleküle wandeln die aus dem Laser absorbierte freie Energie in Anregung des Gitters um, wobei sie elektronisch angeregt werden und unter Mitnahme der eingebetteten Peptide in die Gasphase übergehen. Die anschließende Ionisation der Peptide zu einfach geladenen Ionen ($[M+H]^+$) erfolgt wahrscheinlich durch einen Protonentransfer von photoionisierten, radikalischen Matrixmolekülen.

In dieser Arbeit wurden die Peptide zur massenspektrometrischen Analyse mit einer Matrixlösung, bestehend aus einer gesättigten α -Cyano-4-hydroxycimtsäurelösung in 0,1% TFA/Acetonitril 1:1, auf einem stählernen MALDI Probenträger kokristallisiert. Nach Synthese und RP HPLC-Trennung wurden jeweils 0,3 μ l der peptidhaltigen Fraktionen mit 0,5 μ l Matrixlösung auf dem MALDI Probenträger vereinigt. Nach *in vitro* Acetylierung oder Endoproteinase Lys-C Verdau wurden die Peptide mittels 10 μ l- ZipTip™ Pipettenspitzen (Millipore, Bedford, USA), die an ihrem Auslass eine C18-Säule der Porengröße 20 nm tragen, entsalzt und konzentriert. Dazu wurde die C18 Säule mit 7,5 μ l 50% Acetonitril gespült, mit 7,5 μ l 0,1% TFA äquilibriert und durch dreimaliges Aufziehen von je 2,5 μ l Probe mit Peptiden beladen. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,1% TFA erfolgte die zweimalige Elution der gebundenen Peptide mit jeweils 0,2 μ l Matrixlösung direkt auf den MALDI Probenträger.

Die im MALDI Prozess entstehenden einfach geladenen Peptide werden durch ein Spannungsfeld in Richtung des Flugzeit-Massenanalysators (TOF) beschleunigt und in eine feldfreie Driftstrecke gelenkt, in der sie bezüglich ihres Masse-Ladungs-Quotienten (m/z) getrennt werden. Da sowohl die Beschleunigungsspannung als auch die feldfreie Driftstrecke bekannte Geräteparameter sind, kann der Masse-Ladungs-Quotient und damit die Molekülmasse durch Messung der Flugzeit nach folgender Formel ermittelt werden (m = Molekülmasse, z = Ladung, e = Elementarladung U = Beschleunigungsspannung, t = Flugzeit, L = Länge der feldfreien Driftstrecke):

$$m/z = 2eU t^2 / L^2$$

Zur Massenbestimmung der synthetischen, *in vitro* acetylierten oder proteolytisch gespaltenen Peptide wurde ein MALDI-Flugzeitmassenspektrometer des Typs Reflex II (Bruker-Daltonik, Bremen) benutzt. Das Gerät war mit einer SCOUT Ionenquelle, einem 337 nm Stickstoff-Laser und einem Ionenreflektor ausgestattet und verfügte über eine verzögerte Ionenextraktion (Delayed Extraction).

Die Aufnahme von Massenfingerprintspektren erfolgte im Positivmodus des Ionenreflektors in einem m/z -Bereich von 700 bis 3500 unter einer Beschleunigungsspannung von 26.5 kV, einer primären Extraktionsspannung von 20.6 kV, einer Reflektorspannung von 30.0 kV und einer Detektorspannung von 1,5 kV. Für jedes Fingerprintspektrum wurden bis zu 100 einzelne Laser-Schüsse auf verschiedene Positionen der Präparation abgegeben und aufsummiert. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte extern unter Verwendung einer linearen Zweipunktgeraden basierend auf den bekannten Massen von Angiotensin I und der oxidierten B-Kette des Rinderinsulins.

Neben der prompten Fragmentierung der Peptidionen in der Ionenquelle kommt es zu Fragmentierungen während der Beschleunigung im elektrischen Feld (prompte Fragmentierung, *in source decay*) oder in der feldfreien Driftstrecke (metastabile Fragmentierung, *post source decay*; PSD), wobei in der Regel durch Brechen einer Peptidbindung ein geladenes Fragmention und ein neutrales Fragmentmolekül entstehen. PSD-Ionen, die in der feldfreien Driftstrecke entstehen, fliegen mit der ursprünglichen Geschwindigkeit des Elternions weiter und werden durch variable Reflektorspannungen, die der geringen Energie der PSD-Ionen angepasst werden, auf den Detektor gelenkt.

Die Aufnahme von MALDI Fragmentionenspektren (PSD Analyse) erfolgte mit einer erhöhten Detektorspannung von 1,65 kV im Positivmodus des Ionenreflektors durch Setzen eines Ausschlussfensters von ± 20 Da um die Masse des zu fragmentierenden Peptids. Die einzelnen Abschnitte des Fragmentionenspektrums wurden in 14 Segmenten unter schrittweiser Verringerung der Reflektorspannung aufgenommen, wobei in jedem Segment jeweils bis zu 100 einzelne Laser-Schüsse aufsummiert wurden. Die Zusammensetzung zum Gesamtfragmentionenspektrum erfolgte anschließend unter Verwendung der FAST Software des Geräteherstellers (Bruker-Daltonik, Bremen).

4.2.1.6 Peptidsequenzierung nach Edman

Bei der Peptidsequenzierung nach Edman werden aminoternale Aminosäuren sequentiell modifiziert, vom Peptid abgespalten, in ein stabiles Derivat umgewandelt und anhand ihrer Retentionszeit auf einer RP HPLC-Säule im Vergleich zu einem Aminosäurestandard identifiziert. Dazu wurden die *in vitro* acetylierten Peptide unter Verwendung der ProSorb Probenpräparationstechnik (Applied Biosystems, Foster City, USA) gemäß den Herstellerangaben entsalzt und auf einer PVDF-Membran konzentriert. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Procise Kapillarsequenator des Typs 494 cLC (Applied Biosystems, Foster City, USA) anhand von Standardprogrammen des Herstellers. Die RP HPLC-Säule des

Sequenators wurde dem Fast Column Break IN V2.0 Programm folgend durch mehrmaliges Spülen mit hochkonzentrierter TFA vorbehandelt.

4.2.2 Zellbiologische Methoden

4.2.2.1 Kultivierung der Zelllinien Cos7 und 1G5

Unter optimierten Bedingungen können Tumorzellen unbefristet wachsen, ohne ihren Phänotyp zu ändern, und werden deshalb immortalisierte Zellen genannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die adhärennten Zelllinien 1G5 und Cos7 genutzt. Der Klon 1G5 (#1819) der humanen Jurkat-Zelllinie, die aus einem Patienten mit akuter T-Zelleukämie etabliert wurde, enthält stabil in das Genom integriert den HIV-1 LTR Promotor sowie ein Luciferase-Reportergen und wurde käuflich erworben von Ogden Bioservices (Ogden Bioservices, Rockville, USA). Die aus Primaten stammende Nierenzelllinie Cos7 (# ACC-60) wurde käuflich erworben von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 175 cm²-Kulturflaschen bei 37°C in einer Atmosphäre von 90% Feuchtigkeit bestehend aus 5% CO₂ und 95% Luft. Cos7 Zellen wurden in DMEM Komplettmedium mit Zusatz von 2 mM L-Glutamin, 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin gehalten. Zur Hitzeinaktivierung wurde das fetale Kälberserum für 30 min im 56°C-Wasserbad geschüttelt und durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert. Die Kultivierung von 1G5 Zellen erfolgte in RPMI 1640 Komplettmedium unter Zugabe von 2 mM L-Glutamin, 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin. Da Zellen in Kulturflaschen nur bis zur Konfluenz und bis zum gegenseitigen Zellkontakt wachsen, wurden die 1G5 und Cos7 Zellen jeden dritten Tag im Verhältnis 1:8 subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 4 ml Trypsin-EDTA Lösung gewaschen und für 3 min in 4 ml Trypsin-EDTA Lösung bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml frischem angewärmten Medium wurden die Zellen gleichmäßig resuspendiert und in entsprechenden Volumina in neue Flaschen überführt. Um das Risiko von Kontaminationen durch Mikroorganismen zu vermeiden, wurden alle Schritte unter Verwendung von sterilen Materialien in einer sterilen Sicherheitswerkbank (Baker Company, Stanford, USA) ausgeführt.

4.2.2.2 Lagerung von Zelllinien

Zur Lagerung der Zelllinien wurden die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 100x g sedimentiert und mit einer Endkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml in Einfriermedium, bestehend aus 90% fetalem Kälberserum und 10% DMSO resuspendiert. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein 2 ml Cryogefäß überführt, für 24 h in einer Polystyrolbox bei -70°C vorgefroren und schließlich in einem Stickstofftank bei -196°C eingelagert.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen zügig im 37°C -Wasserbad aufgetaut und in 8 ml angewärmtes Medium überführt. Die Zellsuspension wurde durch zehnmünütige Zentrifugation bei 200x g von DMSO befreit und nach Absaugen des Mediums und Resuspendierung des Zellpellets in frischem Medium in Kulturflaschen überführt.

4.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines Hematocytors unter dem Lichtmikroskop unter 100facher Vergrößerung. Die Zellsuspension wurde im Volumenverhältnis 1:1 mit 0.4% Trypanblau/DMSO verdünnt und in die Kammer des Hematocytors überführt. Unter Beachtung des Verdünnungsfaktors ergibt die Multiplikation mit 2×10^4 der mittleren Zellzahl in einem der vier Quadrate des Hematocytors die Gesamtzellzahl pro ml Suspension.

4.2.2.4 Transiente Transfektionen

Durch die Transfektion einer eukaryotischen Zelle wird fremde Vektor- oder Plasmid DNA durch biochemische oder physikalische Prozesse in die Zelle aufgenommen und dort exprimiert. Diese Technik ist von hohem Nutzen zur Studie der eukaryotischen Genexpression und ihrer Regulation und kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen: durch permanente oder transiente Transfektion. Bei der permanenten Transfektion wird die fremde DNA dauerhaft in das Genom der eukaryotischen Zelle integriert, so dass seine Expression der zellulären Regulation unterliegt und zur Synthese von moderaten Mengen an Zielprotein führt. Dagegen ist die Aufnahme der fremden DNA bei der transienten Transfektionen nur temporär und führt nicht zwangsweise zur Integration in das Zellgenom. Dafür erfolgt aber eine gesteigerte Expression der eingeschleusten Gene, so dass aus transient transfizierten Zellen hohe Mengen an Zielprotein isoliert werden können.

In dieser Arbeit wurden transiente Transfektionen von 1G5 und Cos7 Zellen durchgeführt.

4.2.2.4.1 Aussäen von Zellen für transiente Transfektionen

Für die Transfektion von 1G5 Zellen wurde die Zellzahl einen Tag vor der Transfektion auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt und die Zellsuspension für weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

Für die Transfektion von Cos7 Zellen wurde die Zellzahl zwei Tage vor der Transfektion auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt, und 3 ml dieser Suspension wurden in 5 ml vorgelegtes angewärmtes DMEM in einer 10 cm-Kulturschale überführt. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte die Inkubation bei 37°C für weitere 48 h, wobei das Medium nach 24 h durch frisches DMEM ersetzt wurde.

4.2.2.4.2 DEAE-Dextran vermittelte Transfektion von 1G5 Zellen

Die Diethylaminoethanol (DEAE)-Dextran vermittelte Transfektion von 1G5 Zellen erfolgte mit Plasmiden, die für Glycin 48 Mutanten von FLAG-markiertem Tat codierten. Da die 1G5 Zellen den vollständigen HIV-1 LTR Promotor sowie ein Luciferase-Reporter gen tragen, konnte durch Quantifizierung des Reporter genprodukts das transaktivierende Verhalten der Tat Mutanten unter Einfluss des LTR untersucht werden. Das zur Transfektion genutzte positiv geladene DEAE-Dextran bindet an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und bildet so Aggregate, die mit der negativ geladenen Plasmamembran der Zelle assoziieren. Die Aufnahme des Komplexes beruht wahrscheinlich auf endocytotischen Vorgängen und der Einlagerung in Endosomen.

Zur Studie des transaktivierenden Verhaltens der Tat Mutanten erfolgte die Transfektion von jeweils 8,5, 25, 75 und 225 ng der jeweiligen Plasmid DNA im Duplikatversuch unter sterilen Bedingungen. Um eine gleichbleibende Gesamtmenge von einzuschleusendem Vektor zu gewährleisten, wurde jeweils eine Gesamtmenge von 230 ng Plasmid DNA mit 150 μl STBS auf ein Endvolumen der Ansätze von 300 μl verdünnt, wobei der korrespondierende leere Vektor zum Auffüllen verwendet wurde. 300 μl einer sterilen 900 $\mu\text{g/ml}$ DEAE-Dextran/STBS Lösung wurden zu jedem der Plasmid DNA Ansätze gegeben und die DEAE-Dextran/STBS/DNA Mischung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Transfektionsansatz wurden 3×10^6 1G5 Zellen zweimal mit STBS gewaschen und in einem Volumen von 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei $640 \times g$ folgte die Resuspendierung der Zellen in 300 μl der jeweiligen DEAE-Dextran/STBS/DNA Mischung und die Inkubation für 1 h bei 37°C unter permanentem Schütteln. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, sukzessive mit jeweils 1 ml auf Raumtemperatur angewärmtem STBS und reinem RPMI Medium ohne Zusätze gewaschen und schließlich in 1 ml angewärmtem RPMI

Komplettmedium resuspendiert. Die transfizierten Zellen wurden in Zellkulturplatten, in die jeweils 1 ml angewärmtes RPMI Komplettmedium vorgelegt wurde, ausgesät und für mindestens 16 h bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der inkubierten Zellen mit eiskaltem PBS und ihrem Transfer in 2 ml Reaktionsgefäße erfolgte der vollständige Zellaufschluss wie unter 4.2.2.5 beschrieben.

4.2.2.4.3 Lipofectamin-vermittelte Transfektion von Cos7 Zellen

Anhand der Lipofectamin-vermittelten Cotransfektion von Cos7 Zellen mit FLAG-markierten Tat Glycin 48 Mutantenplasmiden und HA-Cyclin T1 Plasmiden wurde durch Coimmunpräzipitation wie unter 4.2.5.2 beschrieben die Cofaktorbindung der Tat Mutanten untersucht. Lipofectamin ist ein Reagenz bestehend aus Kationen und Lipidmolekülen, die wegen ihrer positiv geladenen Oberfläche gleichzeitig das negativ geladene Rückgrat der DNA und die negativ geladene zelluläre Plasmamembran binden. Die Aufnahme der DNA erfolgt durch Endosomen und Liposomen.

Zur Studie der Cofaktorbindung an die Tat Mutanten erfolgte die Transfektion von Cos7 Zellen mit der jeweiligen Plasmid DNA unter sterilen Bedingungen. Jeweils 3 µg der Tat Mutanten Plasmide wurden mit 3 µg Vektor DNA für HA-markiertes Cyclin T1 sowie mit 1,2 µg LTR-Plasmid gemischt und mit OPTIMEM auf ein Endvolumen von 600 µl eingestellt. Pro Transfektionsansatz wurden 19,2 µl Lipofectamin mit 600 µl OPTIMEM versetzt. Zu jedem der Plasmidgemische wurden 600 µl dieser Lipofectamin/OPTIMEM Lösung gegeben und die Ansätze 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die wie unter 4.2.2.4.1 beschrieben ausgesäten und in DMEM inkubierten Cos7 Zellen wurden mit OPTIMEM gewaschen, mit 4,8 ml OPTIMEM sowie 1200 µl des Lipofectamin/OPTIMEM/Plasmidgemisches versetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. Die Lipofectamin/OPTIMEM/Plasmid Lösung wurde abgesaugt, und die Zellen wurden in frischem DMEM für weitere 16 h bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der inkubierten Zellen mit eiskaltem PBS und ihrem Transfer in 2ml Reaktionsgefäße erfolgte der Zellaufschluss und die nukleäre Extraktion wie unter 4.2.2.6 beschrieben.

4.2.2.5 Vollständiger Zellaufschluss

Der vollständige Zellaufschluss von transfizierten 1G5 Zellen für die Luciferaseaktivität Quantifizierung erfolgte nach dem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS durch Zugabe von je 50 µl Lysepuffer aus dem Luciferase Assay System (Promega, Mannheim) und 30 min

Inkubation unter Schütteln. Die Zellpellets wurden durch 10 min Zentrifugation bei 15000x g und 4°C sedimentiert und der Überstand wie unter 4.2.2.7 beschrieben zur Quantifizierung der Luciferaseaktivität verwendet.

4.2.2.6 Präparation von nukleären Extrakten

Die Präparation von nukleären Extrakten aus cotransfizierten Cos7 Zellen für die Coimmunpräzipitation erfolgte nach dem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS durch Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C. Das Zellpellet wurde durch 6 min Zentrifugation bei 300x g und 4°C sedimentiert, mit jeweils 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und in 4 µl hypotonischem Puffer (HB) resuspendiert, um das Platzen der Zellmembran einzuleiten. Der HB-Puffer setzte sich zusammen aus 20 mM HEPES pH 7,9, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0,5 mM AEBSF und Proteinaseinhibitoren (Roche, Mannheim). Die im Überstand verbleibenden cytosolischen Komponenten wurden durch 20 sek Zentrifugation bei 13000x g und 4°C abgetrennt und die nukleären Pellets in 100 µl Hochsalzpuffer (HSB) aufgenommen. Zur Herstellung des HSB-Puffers wurden dem HB-Puffer 420 mM NaCl sowie 20% Glycerin zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 4°C unter starkem Schütteln erfolgte die Sedimentation von präzipitierter DNA durch 30 min Zentrifugation bei 13000x g und 4°C und die Ermittlung des Proteingehalts des Überstandes durch Bradford Analyse.

4.2.2.7 Quantifizierung der Luciferase Aktivität

Die 1G5 Zellen tragen hinter dem integrierten HIV-1 LTR Promotor (bp 1-791) ein Reportergen, das für das Luciferaseenzym der Feuerfliege codiert. Dieses Enzym katalysiert die biolumineszente Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin und kann nach der Tat-vermittelten Transkription des Gens vom HIV-1 LTR und der anschließenden Translation durch Messung der bei der Reaktion freiwerdenden Lumineszenz quantifiziert werden. Da die Menge an Luciferase der transkriptionellen Rate der Zelle entspricht, kann sie deshalb zur Verhältnisbestimmung der transaktivierenden Wirkung der Tat Glycin 48 Mutanten herangezogen werden.

Die transfizierten 1G5 Zellen wurden wie unter 4.2.2.5 beschrieben aufgeschlossen und 20 µl des Zelllysates mit 100 µl Luciferase Substrat (Luciferase Assay System, Promega) versetzt. Das Licht, das bei der sofort einsetzenden Luciferase-katalysierten Reaktion emittiert wurde, konnte mit einem Luminometer gemessen und nach Konvertierung in relative Lichteinheit (rLU) quantifiziert werden.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Herstellung von Tat Mutanten Plasmiden durch ortsspezifische Mutagenese

Um das biologische Verhalten von nicht acetylierbaren Tat Mutanten zu untersuchen, erfolgte die Herstellung von Plasmiden, die für FLAG-markiertes 2 Exon Tat mit Mutation von Glycin 48 zu Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure codierten. Zur Plasmid-Herstellung wurde der QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) verwendet, dessen methodisches Prinzip auf der Verwendung eines Ausgangsplasmids, welches das gewünschte Insert enthält, sowie von zwei die jeweilige Mutation codierenden Oligonukleotidprimern beruht. Nach der Verlängerung der Primer mittels *Pfu* Turbo DNA Polymerase und Amplifizierung der Mutanten DNA innerhalb einer Polymerase Kettenreaktion wird die Wildtyp DNA mit der Endonuklease *DpnI* verdaut, deren Wirkung auf die methylierte parentale DNA beschränkt ist, aber die frisch synthetisierte Mutanten DNA ausschließt. Somit kann anschließend exklusiv die mutierte Vektor DNA isoliert, in superkompetente Bakterien transformiert und nach Reparatur der Schnittstellen amplifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde als Ausgangsplasmid ein Vektor genutzt, der für FLAG-markiertes 2 Exon-Tat codierte. Die Zusammensetzung der Oligonuklotidprimerpaare, die die Tat Mutanten codierten, wurde unter geringstmöglicher Änderung der Tat Originalsequenz und mit möglichst ähnlichen Schmelzpunkten gewählt. (Anhang 7.3). Ihre jeweiligen Schmelzpunkte wurden entsprechend folgender Formel kalkuliert (N = Länge der Primer in Basenpaaren, %GC = prozentualer Anteil an Guanin und Cytosin, %mismatch= Fehlzuordnung an ausgetauschten Basen):

$$T_m = 81.5 + [0.41 \times (\%GC)] - [675/N] - [\%mismatch]$$

Zur Verlängerung der Mutantenprimer und Amplifizierung der Mutanten DNA wurden jeweils 125 ng der beiden zueinandergehörenden Primer, 1 µl dNTP Gemisch und 2,5 U der *Pfu*Turbo DNA Polymerase mit 20 ng des Ausgangsplasmids gemischt und mit Reaktionspuffer auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht. Nach dem Start der Reaktion für 30 sek bei 95°C folgten 16 Zyklen, die sich wie folgt zusammensetzten: Denaturierung der DNA für 30 sek bei 95°C, Auskühlen der Reaktion für 1 min bei 55°C und Elongation der Primer für 10 min (ca. 1 min/kb) bei 68°C.

Der Verdau des parentalen Plasmids erfolgte durch Zugabe von 10 U Endonuklease *Dpn I* zum Reaktionsgemisch und Inkubation der Reaktion für 1 h bei 37°C. Zur Transformation wurden 50 µl XL1-Blue superkompetente Zellen (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) mit 1 µl der *Dpn I*-

behandelten DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Temperaturschock-vermittelte Transformation erfolgte durch Erhitzen der Reaktion auf 42°C für 45 sek und sofortigem Rücktransfer auf Eis. Die transformierte Bakteriensuspension wurde mit 500 µl SOB Medium für 1 h bei 225 rpm und 37°C inkubiert und anschließend in Aliquots von jeweils 100 und 300 µl auf Ampicillin-haltigen LB Platten ausplattiert. Das SOB-Medium enthielt 2% Bactotrypton, 0,55% Hefeextrakt, 1 mM NaCl und 1 mM KCl und wurde vor Gebrauch mittels eines 0.22 µm Filters sterilfiltriert. Die Bakterienkolonien wurden über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen.

4.2.3.2 Sequenzierung der Tat Mutanten Plasmid DNA

Um diejenigen Bakterienklone zu identifizieren, die die richtigen Tat Mutationen in sich tragen, wurde die DNA von jeweils 5 Klonen im kleinen Maßstab isoliert und mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Bei dieser Methode synthetisiert eine DNA Polymerase aus den vier verschiedenen 3'-Desoxynukleosidtriphosphaten dATP, dGTP, dCTP und dTTP die komplementäre Kopie einer einzelsträngigen parentalen DNA durch Elongation eines 5'-Oligonukleotidprimers. Zusätzlich wird jedem der vier durchgeführten Parallelansätze eines der radioaktiv-markierten 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate ddATP, ddGTP, ddCTP oder ddTTP zugesetzt. Der Einbau eines solchen ddNTPs in die neusynthetisierte DNA-Kopie führt zum basenspezifischen Kettenabbruch, da der DNA an ihrem 3'-Ende die freie Hydroxylgruppe fehlt, die zur weiteren Elongation durch die DNA Polymerase nötig ist. Das ddNTP/dNTP-Verhältnis sollte dabei so eingestellt sein, dass der Kettenabbruch statistisch bei jedem Vorkommen der jeweiligen Base, jedoch nur einmal pro Molekül stattfindet, so dass der Reaktionsansatz nach Beendigung der Reaktion ein Gemisch aus einzelsträngigen DNA Molekülen aller möglichen unterschiedlichen Längen enthält. Diese werden denaturiert und die DNA Einzelstränge der vier Parallelansätze mittels hochauflösender SDS PAGE entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Da die Banden durch die Verwendung von radioaktiv markierten Nukleotiden auf einem Röntgenbild sichtbar gemacht werden können, ist es möglich, die Sequenz direkt nach der Autoradiographie vom Film abzulesen.

In dieser Arbeit erfolgte die α -35S-dATP Sequenzierung der hergestellten Plasmid DNA unter Verwendung des Sequenase Quick-Denature Plasmid Sequencing Kits (Amersham Biosciences, Freiburg). Die DNA der fünf ausgewählten Klone wurde im kleinen Maßstab (MiniPrep) wie unter 4.2.3.3.1 beschrieben isoliert und gereinigt. Jeweils 0,5 pmol der DNA wurden nach Versetzen mit 2 µmol NaOH und 2 pmol T7-Primer für 10 min durch Inkubation bei 37°C denaturiert. Zur Neutralisierung der HCl wurden anschließend 2 µmol HCl sowie 2 µl

Plasmidreaktionspuffer zugesetzt und die Ansätze erneut für 10 min bei 37°C inkubiert. Pro Reaktion wurden 5,5 µl Markierungslösung, bestehend aus 0.1 M DTT, 0.4 µl Markierungsgemisch, 5 µCi of α -35S-markiertem dATP und 2 µl T7 Sequenase, erstellt. Diese Markierungslösung wurde zu den DNA-Ansätzen gegeben, und zur initialen Primerelongation erfolgte die Inkubation der Ansätze für 2-5 min bei Raumtemperatur. Die vier Terminationsgemische wurden in einer 96-well Mikrotiterplatte angesetzt und enthielten 2,5 µl der jeweiligen ddNTP-Stocklösung. Zum Kettenabbruch wurden 4,5 µl Aliquots der markierten elongierten DNA zu jedem der vier Terminationsansätze gegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der DNA Polymerase erfolgte durch Zugabe von 4 µl Stopplösung und Erhitzen der Reaktion für 2 min auf 100°C. Zur Separierung der verschieden langen markierten DNA-Stränge wurden jeweils 2 µl der Terminationsreaktionen auf ein 6%iges Polyacrylamidgel geladen und für 2 h bei 60 W in TBE-Puffer, bestehend aus 45 mM Tris-Borat und 1 mM EDTA, getrennt.

	PA Gel
Sequencing Gel Diluent	10-15%
Sequencing Gel Concentrator	375 mM pH 8,8
APS	0.08%
TEMED	0.04%
TBE	ad 78,7 ml

Nach der Elektrophorese erfolgte die Trocknung des Gels bei 80°C für 2 h und die Detektion der Banden auf einem Biomax MR Film (Amersham Biosciences, Freiburg) bei Raumtemperatur für mindestens 15 h. Das Auslesen der Sequenzen aus den Bandenleitern erfolgte manuell.

4.2.3.3 Isolation von Plasmid DNA aus Bakterienzellen

Die zur Präparation von Plasmid DNA verwendeten Methoden beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Steriles, ampicillinhaltiges LB Medium wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie inokuliert und unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Behandlung mit Protein- und DNA- denaturierenden Lösungen aus SDS und NaOH. Nach Neutralisation des Lyseansatzes mit Kaliumacetat, die zur Präzipitation sowohl der chromosomalen DNA als auch der bakteriellen Proteine führte, konnte die im Überstand verbleibende Plasmid DNA isoliert und gereinigt werden.

4.2.3.3.1 Isolation von Plasmid DNA im kleinen Maßstab (Miniprep)

Die schnelle Isolation von kleinen Mengen Plasmid DNA aus Bakterienzellen zu analytischen Zwecken erfolgte unter Verwendung des Wizard® Plus Miniprep DNA Purification Systems (Promega) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde das Bakterienzellpellet nach der alkalischen Hydrolyse für 15 min durch Zentrifugation bei 10000x g und 4°C sedimentiert und die im Überstand verbleibende Plasmid DNA an eine Trägersäule gebunden. Nach Befreien der Säule von ungebundenem Material durch Waschen mit 95% ethanolischer Waschlösung erfolgte die Elution der Plasmid DNA mit sterilem ddH₂O.

4.2.3.3.2 Isolation von Plasmid DNA im großen Maßstab (Maxiprep)

Die sorgfältige Isolation von großen Mengen Plasmid DNA aus Bakterienzellen zu präparativen Zwecken erfolgte unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurde die Plasmid DNA nach alkalischer Lyse der Bakterienzellen und Abtrennung der Zelltrümmer durch Filtern des Überstandes bei niedrigem Salzgehalt und pH-Wert an eine Anionenaustauschersäule gebunden. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigung wurden durch Waschen der Säule mit einer Lösung mittleren Salzgehalts entfernt und die Plasmid DNA mittels eines Puffers mit hohem Salzgehalt eluiert. Die anschließende Konzentrierung und Entsalzung der isolierten Plasmid DNA erfolgte durch Präzipitation mit Isopropanol.

4.2.3.4 Phenol Chloroform Extraktion von Plasmid DNA

Die Befreiung der isolierten Plasmid DNA von DNasen und Proteinkontaminanten erfolgte durch Extraktion mit Phenol. Nach Zugabe einer Lösung bestehend aus 50% Phenol, 48% Chloroform und 2% Isoamylalkohol präzipitierten die Proteine und sammelten sich in der organischen Phase, während die DNA in der wässrigen Phase verblieb. Die zwei Phasen wurden unter Verwendung von Phase Lock™ Tube Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) durch Zentrifugation getrennt, und restliches Phenol wurde aus der wässrigen Phase durch zwei zusätzliche Extraktionsschritte mit einer Lösung aus 96% Chloroform und 4% Isoamylalkohol entfernt. Die reine Plasmid DNA konnte dann wie folgt aus der wässrigen Phase präzipitiert werden.

4.2.3.5 Präzipitation von Plasmid DNA

Die Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Zugabe des 2,5fachen Volumens an eiskaltem Ethanol in Gegenwart von 10% 3 M Natriumacetat pH 5,4. Nach Inkubation für mindestens 20 min bei -20°C und Sedimentation der gefällten DNA durch Zentrifugation für 20 min bei $15000\times g$ und 4°C wurden Salze und organische Moleküle durch Waschen des Sediments mit eiskaltem 70% Ethanol entfernt. Die DNA wurde erneut sedimentiert, an der Luft getrocknet und in sterilem H_2O gelöst.

4.2.3.6 Quantifizierung von Plasmid DNA

Die Konzentration von Plasmid DNA nach der Isolation und Reinigung wurde ermittelt durch Messen der Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) unter Verwendung eines Spektrophotometers. In wässrigen Lösungen entspricht der Absorptionswert $A_{260} = 1$ einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA. Nach erfolgreicher Abtrennung von Phenol und Proteinkontaminanten sollte dabei das A_{260}/A_{280} Verhältnis der DNA Lösung zwischen 1,8 und 2 liegen.

4.2.3.7 Restriktionsverdau von Plasmid DNA

Zur Überprüfung der Qualität der aus Bakterienzellen isolierten Plasmid DNA erfolgte der Restriktionsverdau von jeweils $1 \mu\text{g}$ Plasmid DNA mit 1 U einer geeigneten Endonuklease in einem Reaktionsvolumen von $20 \mu\text{l}$ für 1,5 h bei 37°C . Im Falle der Plasmide, die für die 2 Exon Tat Glycin 48 Mutanten codierten, erfolgte der Restriktionsverdau unter Verwendung der Endonuklease HindIII in Gegenwart von stabilisierendem BSA. Nach Detektion der entstehenden DNA Fragmente in der anschließenden Agarose Gelelektrophorese konnte die Qualität der isolierten Plasmid DNA bewertet werden.

4.2.3.8 Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese dient der schnellen Trennung von bis zu 25 kb großen DNA Fragmenten zu analytischen und präparativen Zwecken. In dieser Arbeit wurden analytische Gele mit Agarosekonzentrationen zwischen 1% und 2% genutzt, die $0,1 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid enthielten. Nach Restriktionsverdau der jeweiligen Plasmid DNA erfolgte die Aufnahme von 100 ng DNA in Ladungspuffer aus 8,34% Sucrose, 0,02% SDS, 0,025% Bromphenolblau und

8,34 mM Tris-EDTA, pH 8,0. Die elektrophoretische Separation wurde bei einer Spannung von 6 V/cm in TAE Puffer pH 8,5, zusammengesetzt aus 40 mM Tris-Acetat und 1 mM Na₂EDTA, ausgeführt. Die Detektion der aufgetrennten Fragmente erfolgte durch UV Belichtung. Die Auswertung beruhte auf dem Vergleich der Fragmentgröße mit den bekannten Fragmenten einer DNA-Leiter, die durch Verdau des Genoms des λ -Bakteriophagen mit HindIII erzeugt wurde.

4.2.4 Proteinbiochemische Methoden

4.2.4.1 Quantifizierung von Proteinen durch Bradford-Analyse

Die Bradford Analyse basiert auf der Bildung von Proteinkomplexen mit dem Farbstoff Commassie Brilliantblau, deren Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers gemessen werden kann. Der Proteingehalt kann durch Vergleich der gemessenen Absorptionswerte mit den Werten einer Standardkurve abgeschätzt werden. Die Zellysate oder nukleären Extrakte wurden im Verhältnis 1:500 bzw. 1:1000 mit ddH₂O verdünnt, mit Bradford Proteinassay Lösung (Biorad, München) nach Angaben des Herstellers gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufnahme der Absorption bei 595 nm erfolgte auf einem UltraspecII Spektrophotometer (LKB Biochrom, England). Als Standard diente einer Verdünnungsreihe von 80-2.5 μ g BSA.

4.2.4.2 *In vitro* Translation von Plasmid DNA

Durch die Zugänglichkeit eines klonierten Gens in einem Plasmid ist es möglich, das codierte Protein durch eine *in vitro* Translation zu synthetisieren. In dieser Arbeit erfolgten *in vitro* Translationen unter Verwendung des TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip der Methode beruht auf der Klonierung des proteincodierenden Gens in einen Vektor, der einen Promotor für die T7 RNA Polymerase trägt. Diese Polymerase kann somit die entsprechende mRNA für das Zielprotein synthetisieren und zur anschließenden Translation durch Kaninchen-Reticulocytenlysat bereitstellen, welches alle zur Proteinsynthese nötigen zellulären Komponenten wie tRNAs, Ribosomen, Aminosäuren und Translationsfaktoren enthält.

Zur *in vitro* Herstellung der Tat Glycin 48 Mutantenproteine für die unter 4.2.4.4 erläuterten RNA Interaktionsstudien erfolgte die Translation der wie vorangehend beschrieben isolierten Plasmide. Alle Arbeitsschritte wurden in RNase-freier Umgebung bei 4°C ausgeführt, um die Denaturierung der Nukleinsäuren zu vermeiden. Vor Beginn wurden alle verwendeten Plasmide

durch wie in 4.2.3.4 beschrieben Phenol Chloroform Extraktion und Ethanol Präzipitation gereinigt und in DEPC H₂O gelöst. Jeder Translationsansatz enthielt 200 ng Plasmid DNA, 1 mM eines Gemisches aller proteinogenen Aminosäuren exklusive Methionin, 8 U des Ribonukleaseinhibitors RNasin, 8 µCi ³⁵S-Methionin, 5 µl Kaninchen-Reticulocytenlysate und 0,2 µl T7 RNA Polymerase in 10 µl Reaktionspuffer. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes für 90 min bei 30°C. Zur Überprüfung der Translation wurden die Proteine anschließend wie unter 4.2.4.3 beschrieben durch SDS PAGE getrennt und im Gel fixiert. Nach Trocknung des Gels konnten die Banden aufgrund der ³⁵S-Methioninmarkierung durch Autoradiographie auf einem Biomax MR Film (Amersham Biosciences, Freiburg) detektiert werden.

4.2.4.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das die Denaturierung von Proteinen bewirkt und ihre Eigenladung proportional zum Molekulargewicht mit seiner negativen Ladung überdeckt. Bei der Wanderung der Proteine in einem elektrischen Feld durch eine Polyacrylamidmatrix von einheitlicher Porengröße erfolgt ihre Trennung nach der molekularen Größe.

Die in dieser Arbeit verwendeten SDS PA-Gele besaßen Dimensionen von 9 x 6 x 0,75 cm und Acrylamidkonzentrationen von 4% im oberen konzentrierenden Teil und von 10-15% im trennenden unteren Teil, je nach Größe der zu separierenden Proteine. Die Copolymerisation der Acrylamidmonomere mit dem N,N'-Methylenbisacrylamidvernetzer zur chemisch inerten Polyacrylamidmatrix wurde unmittelbar vor Gießen des Gels durch die Bildung von freien Radikalen nach Zugabe von Ammoniumpersulfat und seinem Stabilisator N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) eingeleitet.

	Trenngel	Konzentrierungsgel
3 % Acrylamid/ 0.8% Bisacrylamid	10-15%	4%
Tris-HCl	375 mM pH 8,8	125 mM pH 6,8
SDS	0.1%	0.1%
Glycerin	5%	/
APS	0.08%	0.08%
TEMED	0.07%	0.1%

Die zu trennenden Proteine wurden nach Denaturierung durch zweiminütiges Erhitzen auf 100 °C in Lämmli-Ladungspuffer auf Eis abgekühlt und unverzüglich auf das Gel geladen. Ihre elektrophoretische Separation erfolgte bei 4°C für 1 h bei 200 V in denaturierendem Laufpuffer aus 25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM Glycin und 0,1% SDS.

2x Lämmli-Ladungspuffer	
125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
4%	SDS
20%	Glycerin
1,2%	Bromphenolblau
2%	β-Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach Beendigung der SDS PAGE durch 5 min Schütteln in einer Entfärbelösung aus 50% Methanol und 10% Essigsäure in der Gelmatrix fixiert und ihr Signal durch Einlegen in eine amplifizierende Lösung (Amersham Biosciences, Freiburg) verstärkt. Nach Trocknung des Gels für 2 h bei 80°C erfolgte die Detektion der Banden durch Autoradiographie auf einem BioMax MR Film (Amersham Biosciences, Freiburg). Als Größenstandard diente der Benchmark Molekulargewichtsmarker (Invitrogen, Karlsruhe).

4.2.4.4 Protein RNA Interaktionsstudie

Die Untersuchung der TAR RNA Bindung der *in vitro* translatierten Tat Glycin 48 Mutanten erfolgte unter Verwendung eines synthetischen aminoterminal biotinylierten TAR RNA Elements (Bio~CCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGG, Xeragon, USA). Pro Tat Mutante wurden 30 µl 50% Streptavidin-Sepharose Beads (Amersham Pharmacia Biotech) für 1 h bei 4°C mit 3% BSA in Bindungspuffer blockiert und nach zweimaligem Waschen mit jeweils 0,5 µg TAR RNA beladen. Der Bindungspuffer setzte sich zusammen aus 97,6 mM Na₂HPO₄, 12,4 mM NaH₂PO₄, 250 mM NaCl, 30 mM Na Pyrophosphate, 5 mM EDTA, 10 mM NaF und 0.1% NP-40. Die Bindung erfolgte für 1 h bei 4°C unter Rotation. Nach erneutem zweimaligen Waschen der Beads wurden zwischen 1 und 2 µl der *in vitro* Translationsansätze zugegeben, wobei die jeweilige Proteinmenge aufgrund der Bandenstärke der durch SDS PAGE getrennten Proteine nach Autoradiographie abgeglichen wurden. Die Reaktionen wurden 10 min bei 30°C inkubiert, dreimal mit Bindungspuffer gewaschen und die Beads in jeweils 20 µl Lämmli Ladungspuffer für 5 min auf 100°C erhitzt. Je 15 µl der aufgekochten Ansätze wurden mittels SDS PAGE getrennt, die Tat Mutanten-Proteine nach Fixierung und Amplifizierung der Signale durch Autoradiographie auf einem BioMax MR Film (Amersham Biosciences, Freiburg) detektiert.

4.2.5 Immunologische Methoden

4.2.5.1 Western Blot Analysen

Western Blot Analysen dienen der Identifizierung von Antigenen durch spezifische mono- oder polyklonale Antikörper. Nach Trennung der antigenen Proteine mittels SDS PAGE werden sie unter Einfluss eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes auf eine PVDF- oder Nitrozellulosemembran transferiert und dort immobilisiert. Nach der Bindung des spezifischen Antikörpers (Erstantikörper) an das Antigen erfolgt die Detektion des Komplexes durch ein Erstantikörper spezifisches Immunglobulin (Zweitantikörper), an das das Peroxidaseenzym aus Meerrettich (horse reddish peroxidase, HRP) gekoppelt ist. Unter Verwendung von luminiszenten Substraten dieses Enzyms erfolgt die quantitative Detektion der Antikörper und damit des Antigens.

In dieser Arbeit wurden elektrophoretisch getrennte Proteine unter Verwendung der Tankblotting Methode auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher& Schuell, Einbeck) transferiert. Dazu wurde das PA-Gel in Transferpuffer äquilibriert, der Blotsandwich bestehend aus einem Filterpapier, einem Schwammpad, dem Gel, der Membran, einem zweiten Schwammpad und einem zweiten Filterpapier in einer Kassette assembliert und in den mit Transferpuffer gefüllten Tank eingesetzt, so dass die negativ geladenen Proteine unter Einfluss des angelegten elektrischen Feldes vom Gel in Richtung der Anode auf die Membran wanderten. Der verwendete Transferpuffer enthielt 20% Methanol, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM Glycin und 0,1% SDS, und der Transfer erfolgte über Nacht bei 26 V und 4°C. Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in Blockierungspuffer bestehend aus 5% Magermilch in Waschpuffer für mindestens 1 h blockiert. Der Waschpuffer enthielt 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 0,05% Tween-20. Zur Detektion der FLAG-markierten Tat Proteine wurde eine 1:400 Verdünnung eines anti-FLAG spezifischen monoklonalen Mausantikörpers (M2) in Blockierungspuffer verwendet; die Detektion des HA-markierten Cyclin T1 Proteins erfolgte durch eine 1:100 Verdünnung eines anti-HA spezifischen polyklonalen Rattenantikörpers. Die Membran wurde 1 h unter Rotation mit der Erstantikörperlösung inkubiert, dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit dem jeweiligen Spezies-spezifischen Zweitantikörper 1 h inkubiert. Der Anti-Maus Zweitantikörper wurde dazu 1:25000, der Anti-Ratte Zweitantikörper 1:20000 in Blockierungspuffer verdünnt. Vor der chemiluminiszenten Detektion der Proteine wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen, getrocknet und mit der Substratlösung bestehend aus Luminol, Wasserstoffperoxid sowie einer signalverstärkenden Lösung (ECL, Amersham) für 1 min umspült. Detektion und

Entwicklung der HRP-Signale erfolgten nach vollständiger Entfernung der Lösungen durch Exposition der Membran auf einen medizinischen Röntgenfilm (Fuji Photo Film, Düsseldorf). Zur Detektion verschiedener Proteine aus der gleichen SDS PAGE wurde die Membran nach Durchführung der ersten Antigendetektion 30 min bei 50°C in einem angewärmten reduktiven Stripp-Puffer aus 2% SDS, 65,5 mM Tris-HCl, pH 6,7 und 100 mM 2-Mercaptoethanol inkubiert, zweimal in Waschpuffer gewaschen und zur zweiten Western Blot Analyse verwendet.

4.2.5.2 Coimmunpräzipitation von Proteinen

Eine Coimmunpräzipitation dient der Isolation eines Antigens durch die Bindung an seinen spezifischen Antikörper, der an eine sedimentierbare Matrix gekoppelt wurde. Unter sanften Bedingungen erfolgt dabei auch die Isolation von an das Antigen gebundenen Proteinen, die anschließend aus dem Komplex befreit, detektiert und quantifiziert werden können.

In dieser Arbeit erfolgte die Immunpräzipitation der überexprimierten FLAG-markierten Tat Glycin 48 Mutantenproteine aus nukleären Extrakten von transfizierten Cos7 Zellen, um den Einfluss der Mutationen auf die nukleäre Lokalisation der Proteine zu ermitteln. Der verwendete anti-FLAG spezifische monoklonale Mausantikörper (M2) wurde dazu nichtkovalent an eine Protein A-Sepharosematrix gebunden, und die Tat Mutanten Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert. Da die Cos7 Zellen wie unter 4.2.2.4.3 beschrieben mit FLAG-markiertem Tat und HA-markiertem Cyclin T1 cotransfiziert wurden, konnte die bei der FLAG-Tat Immunpräzipitation stattfindende Coimmunpräzipitation von HA-Cyclin T1 zur gleichzeitigen Bestimmung der Cofaktor Bindungsfähigkeit der Mutanten ausgenutzt werden.

Zur Kopplung des anti-FLAG spezifischen monoklonalen Mausantikörpers (M2) wurden je 50 µl 50% Protein A-Sepharose Beads dreimal mit 500 µl hypotonischem Puffer (HB), versetzt mit 50 mg/ml BSA, für 1 h bei 4°C unter Rotation äquilibriert und die freien Bindungsstellen blockiert. Der HB-Puffer setzte sich zusammen aus 20 mM HEPES pH 7,9, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.5 mM AEBSF und Proteinaseinhibitoren. Nach erneutem Waschen mit HB-Puffer wurden 20 µl der blockierten Beads mit 200 µg der nukleären Extrakte in einem Endvolumen von 200 µl HB-Puffer versetzt und zur Vorreinigung für 1 h bei 4°C rotiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden gemeinsam mit der Protein-A Sepharosematrix durch Zentrifugation für 10 min bei 300x g und 4°C sedimentiert und der Überstand mit 30 µl frischen blockierten Beads und 5 µg M2 Antikörper versetzt. Die immunchemische Komplexbildung erfolgte über Nacht bei 4°C unter Rotation. Nach Sedimentierung der Komplexe bei 300x g und 4°C wurden die Beads mit jeweils 1 ml hypotonischem Waschpuffer (HB Wash) gewaschen und in 20 µl Lämmli Ladungspuffer für 5

min auf 100°C erhitzt. Der HB Waschpuffer hatte die gleiche Zusammensetzung wie der HB-Puffer, enthielt aber zusätzlich 120 mM NaCl und 0,3% NP-40. Je 15 µl der aufgekochten Ansätze wurden mittels SDS PAGE getrennt und die FLAG-Tat und HA-Cyclin T1 Proteine durch Western Blot Analysen detektiert.

5 Ergebnisse

5.1 Die enzymatische Acetylierung von HIV-1 Tat durch die p300 Acetyltransferase

Vorangehende immunchemische Studien haben gezeigt, dass das Tat ARM von der Acetyltransferase p300 acetyliert wird [Ott et al., 1999; Kiernan et al., 1999]. Da das Ziel der vorliegenden Arbeit die umfassende Analyse der Acetylierung von Tat mit Hilfe von biochemischen Methoden ist, wurde zunächst diese bekannte Tat ARM Acetylierung bestätigt. Die Studien erfolgten an einer Reihe von synthetischen Peptiden (Anhang 7.1), die den verschiedenen in Abb. 5.13 dargestellten Regionen des Tat Proteins entsprechen, sowie an dem synthetischen vollständigen 1 Exon Tat Protein (Aminosäure 1-72). Diese Substrate wurden *in vitro* in der Gegenwart von AcCoA und p300 acetyliert und nach anschließender Konzentrierung und Entsalzung mittels MALDI TOF MS, Endoproteinase Lys-C Verdau und Edman Sequenzierung analysiert.

5.1.1 p300 acetyliert das ARM von Tat

Bei der MALDI TOF MS Analyse eines dem Tat ARM entsprechenden Peptids ($^{45}\text{ISYGRKKRR}^{53}$) wurde nach der Inkubation mit AcCoA und p300 zusätzlich zum Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1164 ein zusätzliches Signal bei m/z 1206 detektiert (Abb. 5.1, oberes Spektrum). Diese Massenverschiebung von + 42 Da entspricht einer Acetylgruppe (+ COCH_3) und weist darauf hin, dass eine einzige Acetylgruppe kovalent an das Peptid gebunden wurde. Ein Signal bei m/z 1248, welches einer doppelten Acetylierung entspricht, konnte auch nach zweistündiger Inkubation des Peptids mit AcCoA und p300 nicht detektiert werden. In der Routine erfolgte die Reaktion nicht quantitativ, sondern wurde der allgemein üblichen Durchführung von Acetylierungsstudien entsprechend nach 30 min durch Einfrieren beendet. Der im Ansatz verwendete HEPES Acetylierungspuffer enthielt neben Spuren von Kalium- und Natriumsalzen hohe Mengen an Natriumbutyrat, einem effektiven Deacetylase Inhibitor, um eine unerwünschte Deacetylierungs-Gegenreaktion zu vermeiden. Aus diesen Gründen sind im MALDI TOF MS Spektrum auch nach der Konzentrierung und Entsalzung der Acetylierungsprodukte sowohl Signale für das nichtacetylierte Tat ARM Peptid als auch für die Natriumaddukte des nichtacetylierten und des einfach acetylierten Peptids sichtbar. Letztere konnten anhand ihrer charakteristischen Massenverschiebung von + 22 Da identifiziert werden. Eine für Kaliumaddukte charakteristische Verschiebung von + 38 Da wurde seltener beobachtet. Um eine mögliche nichtenzymatische Acetylierung des Tat ARM Peptids auszuschließen, wurde

zusätzlich ein negativer Kontrollansatz untersucht, der in Gegenwart von AcCoA, aber in Abwesenheit von p300 durchgeführt wurde. Das MALDI TOF MS Spektrum dieser negativen Kontrolle zeigte nur die Signale des nichtacetylierten Peptids und seines Natriumaddukts, nicht aber die des einfach acetylierten Peptids (Abb. 5.1, unteres Spektrum).

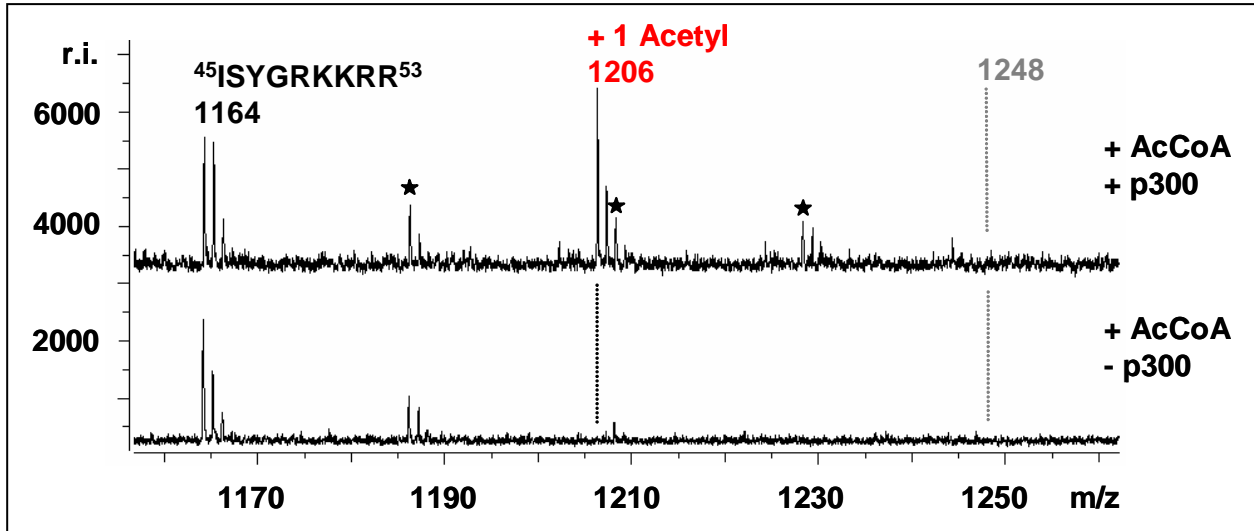


Abb. 5.1: p300 acetyliert das ARM von Tat. MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat ARM Peptids ISYGRKKRR (Aminosäuren 45-53). Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurde neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1164 ein zusätzliches Signal bei m/z 1206 detektiert (rote Markierung). Die Massenzunahme von + 42 Da ist charakteristisch für eine einfache Acetylierung. Kein Signal wurde gefunden für das zweifach acetylierte Peptid bei m/z 1248 (gepunktete Markierung). Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden keine einer Acetylierung entsprechenden zusätzlichen Signale detektiert (gepunktete Markierung). ★Natriumaddukte

Diese Ergebnisse bestätigen somit die einfache enzymatische Acetylierung der Tat ARM durch p300.

5.1.2 p300 acetyliert Lysin 50 im ARM von Tat

Tat umschließt in seinem ARM zwei Lysine, Lysin 50 und 51. Um zu analysieren, welcher dieser beiden Reste von p300 acetyliert wird, wurde ein *in vitro* acetyliertes Tat ARM Peptid einem Endoproteinase Lys-C Verdau unterzogen; die Spaltprodukte wurden durch anschließende MALDI TOF MS identifiziert. Da die Auswertung von MALDI TOF MS Spektren vereinfacht wird, wenn die m/z-Werte der Analyten deutlich über dem Massenbereich der Matrixionen (m/z 500-800) liegen, wurde hierzu ein um fünf Reste verlängertes Tat ARM Peptid ($^{45}\text{ISYGRKKRRQRRRP}^{58}$) verwendet.

Die Endoproteinase Lys-C hydrolysiert spezifisch die Peptidbindung auf der carboxyterminalen Seite von unmodifizierten Lysinresten, wohingegen Peptidbindungen nach an der ϵ -Aminogruppe modifizierten Lysinen gegen die Spaltung resistent sind [Ott et al., 1999; Zhang et al., 2002]. Wie in Abb. 5.2A dargestellt, kann diese Spezifität von Lys-C zur Identifizierung der

Acetylierungsstelle von p300 im Tat ARM ausgenutzt werden. Die Spaltung des an Lysin 50 acetylierten Peptids erfolgt ausschließlich auf der carboxyterminalen Seite des unmodifizierten Lysin 51 und ergibt das acetylierte aminoterminalen Produkt $^{45}\text{ISYGR}^{\text{ac}}\text{KK}^{51}$ mit einem m/z-Wert von 893 und das korrespondierende carboxyterminale Fragment $^{52}\text{RRQRRRP}^{58}$ (m/z 1024). Dagegen wird das an Lysin 51 acetylierte Peptid von Lys-C exklusiv carboxyterminal von Lysin 50 gespalten und resultiert in der Bildung des nichtacetylierten aminoterminalen Fragments $^{45}\text{ISYGRK}^{50}$ (m/z 723) und des acetylierten carboxyterminalen Produkts $^{51\text{ac}}\text{KRRQRRRP}^{58}$ mit einem m/z-Wert von 1194.

In der durchgeführten MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat ARM Peptids ($^{45}\text{ISYGRKKRR}^{53}$) konnte neben den Spaltprodukten des unmodifizierten Peptids mit m/z-Werten von 723, 852, 1024 und 1152 ein zusätzliches Signal bei m/z 893 detektiert werden (Abb. 5.2B, oberes Spektrum). Dieses Signal ist gegenüber dem des Peptids $^{45}\text{ISYGRKK}^{51}$ (m/z 851) um + 42 Da verschoben und weist auf eine Spaltung auf der carboxyterminalen Seite von Lysin 51 hin. Aufgrund der Spezifität von Lys-C für unmodifizierte Lysine muss in diesem Peptid das Lysin 51 in unmodifizierter Form und das Lysin 50 in acetylierter Form vorliegen. Dagegen konnte das für die Lysin 51 Acetylierung charakteristische Signal bei m/z 1194 nicht detektiert werden, so dass zumindest eine signifikante Acetylierung von Lysin 51 unter den angewandten Bedingungen auszuschließen ist. Das Erscheinen der unmodifizierten Spaltungsprodukte $^{45}\text{ISYGRK}^{50}$ (m/z 723), $^{45}\text{ISYGRKK}^{51}$ (m/z 851), $^{52}\text{RRQRRRP}^{58}$ (m/z 1024) und $^{51}\text{KRRQRRRP}^{58}$ (m/z 1152) im MALDI TOF Spektrum ist wiederum auf die nichtquantitative Acetylierungsreaktion zurückzuführen und erlaubt keine weiteren Rückschlüsse auf die Acetylierungsstelle in diesem Peptid. Im negativen Kontrollexperiment nach Inkubation des Peptids mit AcCoA allein in Abwesenheit von p300 wurden wie erwartet ausschließlich die Signale dieser vier unmodifizierten Spaltungsprodukte, nicht aber das Signal bei m/z 893 beobachtet (Abb. 5.2B, mittleres Spektrum). Als zusätzliche Kontrolle wurde das Lys-C Spaltungsmuster eines bereits während der schrittweisen Synthese chemisch an Lysin 50 acetylierten Tat ARM Peptids ($^{45}\text{ISYGR}^{\text{ac}}\text{KRRQRRRP}^{58}$) mittels MALDI TOF MS bestimmt. Wie vorhergesagt enthielt das Spektrum ausschließlich die Signale der Peptide $^{45}\text{ISYGR}^{\text{ac}}\text{KK}^{51}$ (m/z 893) und $^{52}\text{RRQRRRP}^{58}$ (m/z 1024) und entsprach damit dem Acetylierungsmuster des Tat ARM Peptids nach der *in vitro* Acetylierungsreaktion (vergleiche Abb. 5.2B, unteres und oberes Spektrum).

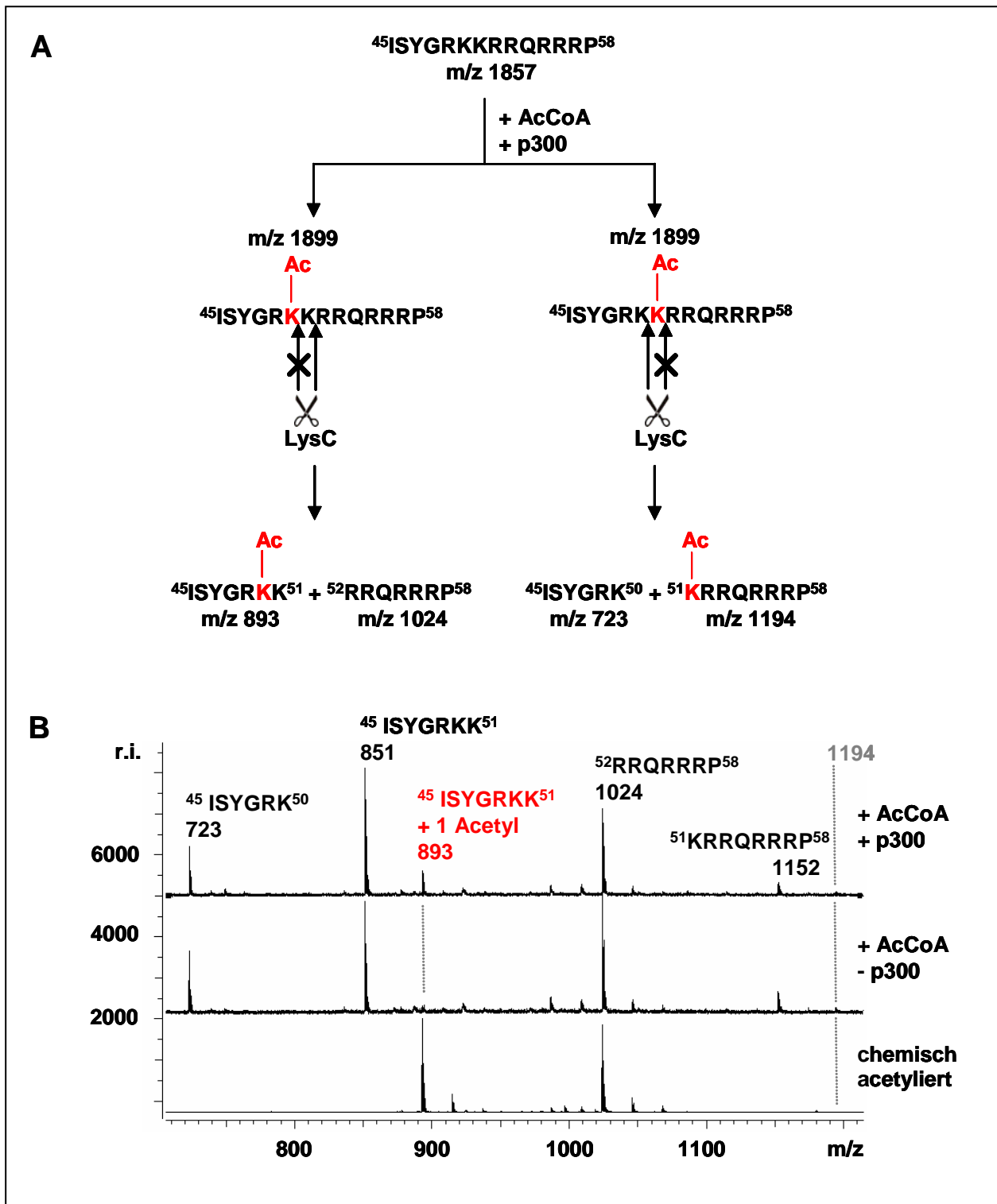


Abb. 5.2: p300 acetyliert Lysin 50 im ARM von Tat. A: Theoretischer Verdau von einfach acetylierten Tat ARM Peptiden (Aminosäuren 45-58) durch Endoproteinase Lys-C. Da Lys-C ausschließlich Peptidbindungen auf der carboxyterminalen Seite von unmodifizierten Lysinresten hydrolysiert, entsteht nach Spaltung des an Lysin 50 acetylierten Peptids ein acetyliertes aminoterminales Produkt mit m/z 893, wohingegen nach Spaltung des an Lysin 51 acetylierten Peptids ein acetyliertes carboxyterminales Produkt mit m/z 1194 entsteht. B: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat ARM Peptids ISYGRKKRRQRRRP (Aminosäure 45-58) nach Lys-C Verdau. Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurde ein Signal bei m/z 893 detektiert, welches auf die enzymatische Acetylierung von Lysin 50 hinweist (rote Markierung). Kein Signal wurde gefunden für das an Lysin 51 acetylierte Spaltprodukt bei m/z 1194 (gepunktete Markierung). Mittleres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden keine acetylierten Spaltprodukte detektiert (gepunktete Markierung). Unteres Spektrum: Lys-C Spaltungsmuster eines bereits während der schrittweisen Synthese chemisch an Lysin 50 acetylierten Tat ARM Peptids ISYGR^{ac}KKRRQRRRP (Aminosäuren 45-58). Hierbei wurden wie erwartet ausschließlich Signale bei m/z 893 und m/z 1024 beobachtet.

Die Charakterisierung der Acetylierungsstellen von p300 in Tat erfolgte zusätzlich nach *in vitro* Acetylierung des synthetischen vollständigen 1 Exon Tat Proteins (Aminosäure 1-72) und anschließendem Lys-C Verdau. Im MALDI TOF MS Spektrum konnte wiederum nur ein einziges um + 42 Da verschobenes Signal detektiert werden. Wie in den oberen Spektren in Abb. 5.3A und B gezeigt, handelte es sich dabei erwartungsgemäß um das Signal des acetylierten Tat ARM Peptids $^{42}\text{ALGISYGR}^{\text{ac}}\text{KK}^{51}$ (m/z 1135), welches auch hier aufgrund der nichtquantitativen Reaktion von den Signalen der unmodifizierten Tat ARM Peptide $^{42}\text{ALGISYGRK}^{50}$ (m/z 965) und $^{42}\text{ALGISYGRKK}^{51}$ (m/z 1093) begleitet wurde.

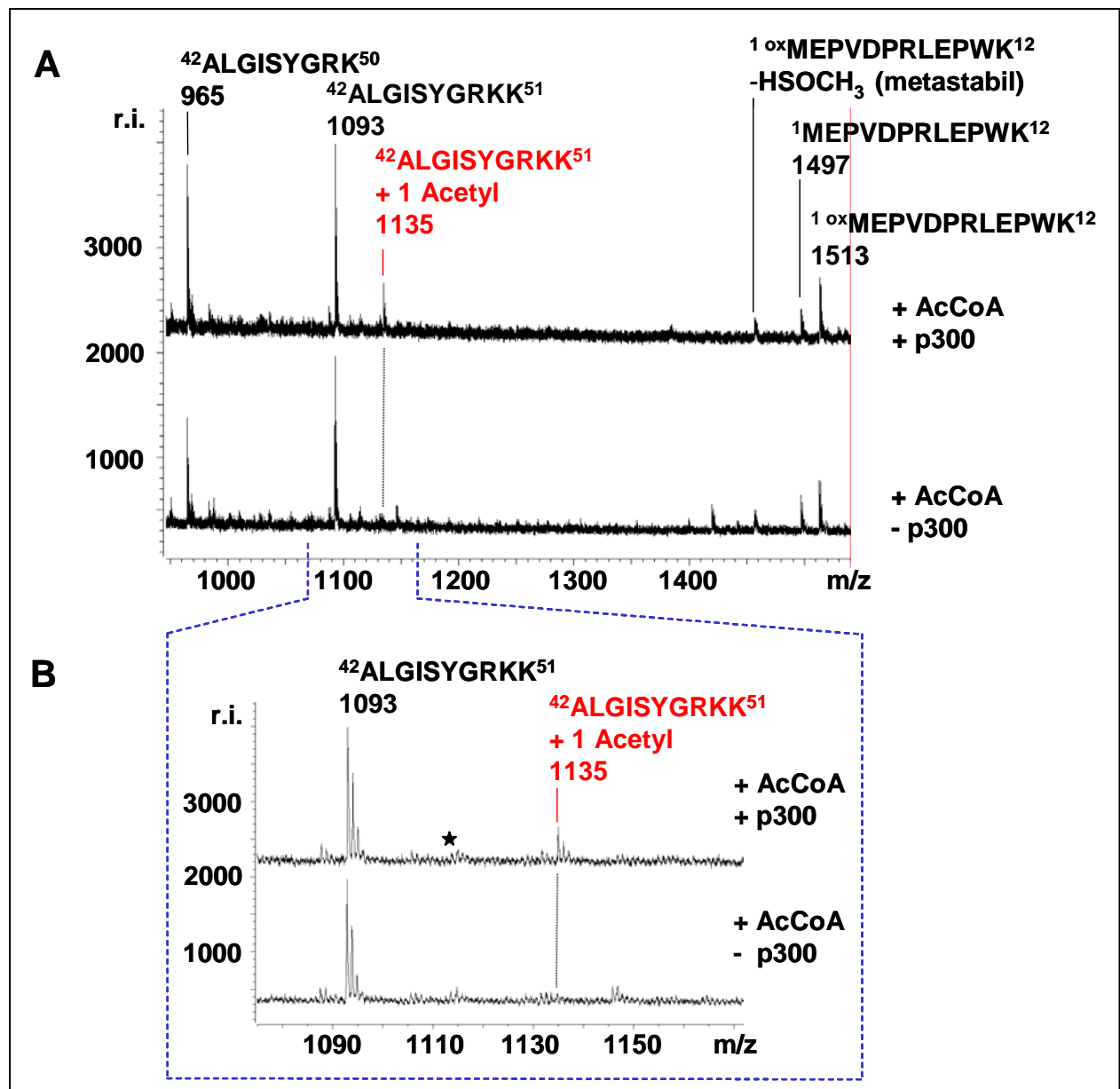


Abb. 5.3: Lysin 50 ist die einzige spezifische Acetylierungsstelle von p300 in Tat. MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat Proteins (Aminosäuren 1-72) nach Lys-C Verdau. A: Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurde ein einziges zusätzliches Signal bei m/z 1135 detektiert, welches auf die enzymatische Acetylierung von Lysin 50 im Peptid ALGISYGRacKK (Aminosäuren 42-51) hinweist (rote Markierung). Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden keine acetylierten Spaltprodukte detektiert (gepunktete Markierung). B: Vergrößerung des m/z-Bereichs 1080-1170 der MALDI TOF MS Spektren in A. ★Natriumaddukte

Im MALDI TOF MS Spektrum des in p300 Abwesenheit durchgeführten negativen Kontrollexperiments dagegen fehlte das Signal bei m/z 1135 (Abb. 5.3A und B, unteres Spektrum), was eine nichtenzymatische Bindung der Acetylgruppe an das Peptid ausschließt. In keinem der beiden Ansätze konnte ein Signal für das an Lysin 51 acetylierte Peptid $^{51ac}KRRQRRRPPQGSQTHQVSLSK^{71}$ (m/z 2574) detektiert werden, was auf eine exklusive Acetylierung von Lysin 50 hinweist.

Somit wurde sowohl auf Peptid- als auch auf Proteinebene Lysin 50 als einziges spezifisches Acetylierungsziel von p300 in Tat identifiziert. Weiterhin bewies die beschriebene Untersuchung den Nutzen der Kombination des proteolytischen Verdaus mit der MALDI TOF MS zur Charakterisierung von enzymatischen Acetylierungsstellen in Peptiden, da die Spaltung einer Peptidbindung mittels der Endoproteinasen Lys-C oder Trypsin durch die Acetylierung von Lysinresten verhindert wird und die Spaltungsprodukte im MALDI TOF Spektrum leicht zu identifizieren sind.

Um die Acetylierungsstelle von p300 in Tat mit Hilfe einer weiteren biochemischen Methode zu bestätigen, wurde das *in vitro* acetylierte Tat ARM Peptid ($^{45}ISYGRKKRRQRRR^{58}$) der Sequenzierung nach Edman unterzogen. Hierbei werden aminoterminal Aminosäuren sequentiell mit Phenylisothiocyanat (PITC) modifiziert, vom Peptid abgespalten, in ein stabiles Phenylthiohydantoin (PTH) Derivat umgewandelt und anhand ihrer Retentionszeit auf einer RP HPLC Säule identifiziert [Grant et al., 1997; Hewick et al., 1981]. Nach der Inkubation des Tat ARM Peptids mit AcCoA allein in Abwesenheit von p300 und anschließendem Edman Abbau zeigten die beiden Lysinreste 50 und 51 wie erwartet eine Retentionszeit von circa 22 min, die dem PTH Derivat von Lysin im PTH Aminosäurestandard entsprach (Abb. 5.4, linke Spalte, Residue 6 und 7). Dagegen wurde nach Inkubation des Peptids in Gegenwart von AcCoA und p300 im Edman Abbauschritt für Lysin 50 ein zusätzlicher Peak mit einer Retentionszeit von circa 10 min detektiert (Abb. 5.4, rechte Spalte, Residue 6). Unter Verwendung des chemisch an Lysin 50 acetylierten Kontrollpeptids ($^{45}ISYGRacKKRRQRRR^{58}$) konnte sichergestellt werden, dass diese Retentionszeit in der Tat dem PTH Derivat eines acetylierten Lysinrestes entspricht (ohne Abb.). Auch in der Edman Sequenzierung zeigte sich nach *in vitro* Acetylierung im Abbauschritt von Lysin 50 ein zusätzlicher Peak mit einer für unmodifizierte Lysine charakteristischen Retentionszeit von circa 22 min, da die Reaktion wie oben erläutert nicht quantitativ erfolgte. Im darauffolgenden Abbauschritt von Lysin 51 wurde der für Acetyl-Lysin charakteristische Peak mit der Retentionszeit von circa 10 min mit einer sehr geringen Intensität beobachtet (Abb. 5.4, rechte Spalte, Residue 7). Dieses kann jedoch nicht als Hinweis auf eine Acetylierung von Lysin 51 interpretiert werden, sondern muss auf einen unvollständigen

vorangehenden Abbauschritt von Acetyl-Lysin 50 und auf eine leicht schwankende repetitive Ausbeute des verwendeten Proteinsequenzierers zurückgeführt werden [Grant et al., 1997].

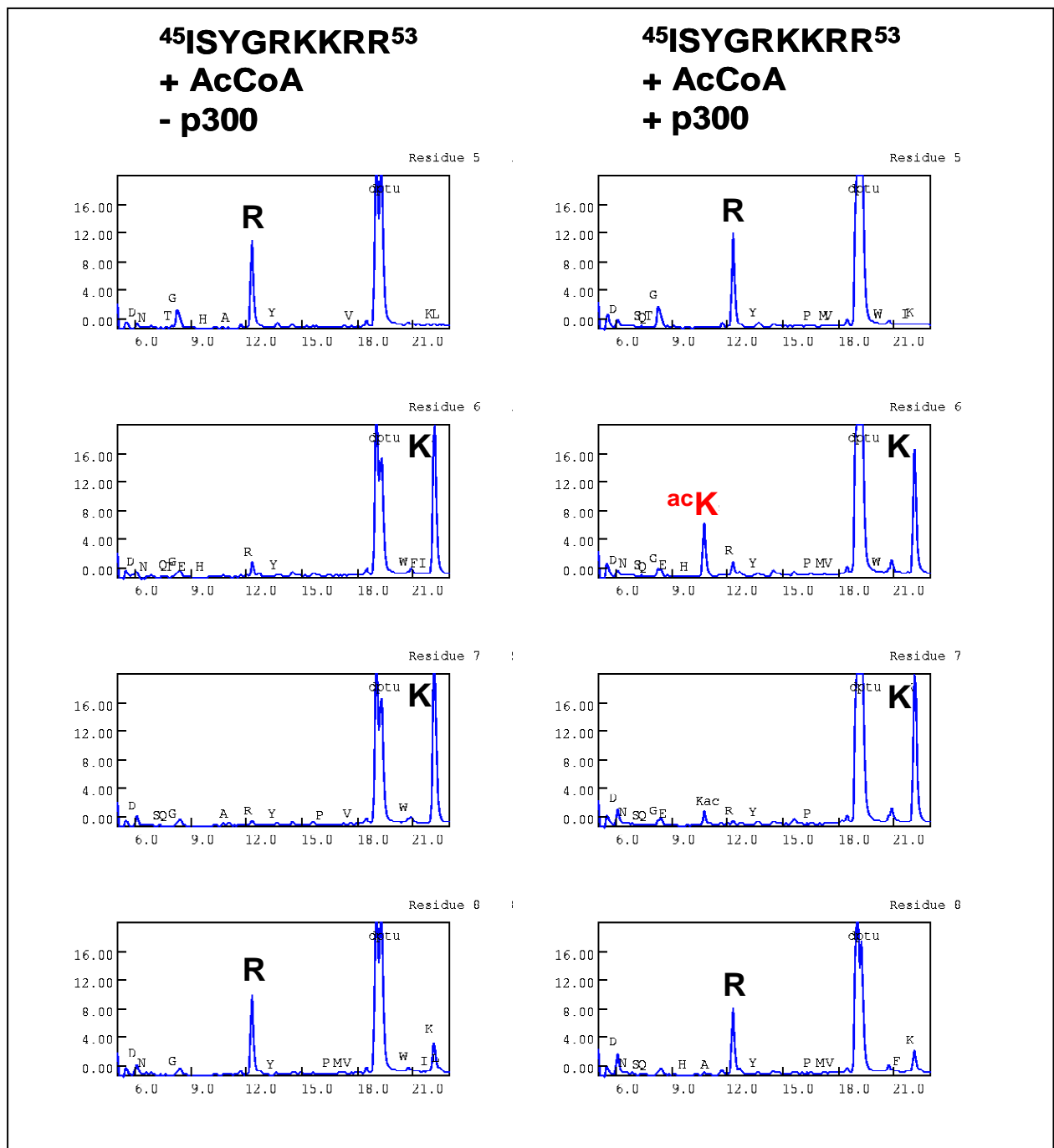


Abb. 5.4: Acetylierte Lysine im Tat ARM können mittels Edman Sequenzierung identifiziert werden. Abbauschritte 5 bis 8 der Sequenzanalyse des *in vitro* mit p300 acetylierten Tat ARM Peptids ISYGRKKRR (Aminosäure 45-53). Linke Spalte: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 waren die Retentionszeiten der PTH Derivate von Lysin 50 und 51 (Abbauschritt 6 und 7) identisch mit der des Lysinrestes im PTH Standard. Rechte Spalte: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurde für Lysin 50 (Abbauschritt 6) ein zusätzlicher Peak detektiert (rote Markierung), dessen Retentionszeit von ca. 10 min charakteristisch ist für das PTH Derivat acetylierter Lysine.

Zusammenfassend bestätigten die beschriebenen biochemischen Analysen von *in vitro* acetylierten Tat Peptiden und vollständigem Tat Protein, dass p300 spezifisch Lysin 50 im ARM acetyliert. Damit wurde auch der Nutzen dieser Methoden, insbesondere des proteolytischen Verdauens in Kombination mit MALDI TOF MS und der Edman Sequenzierung, für die Charakterisierung von enzymatischen Acetylierungsstellen bekräftigt.

5.1.3 Einfluss der umgebenden Peptidsequenz auf die Acetylierung von Lysin 50 durch p300

Trotz der zunehmenden Zahl an bekannten Substraten konnte bisher keine allgemein gültige Konsensussequenz für die Acetylierung von Lysinen durch p300 ermittelt werden. Um den Einfluss der spezifischen Peptidsequenz des Tat ARM auf die enzymatische Acetylierung von Lysin 50 durch p300 zu bestimmen, wurden verschiedene Serien von ARM Peptiden synthetisiert, die sich von der Wildtypsequenz durch Austausch jeweils einer Aminosäure in den Positionen 46, 48, 49, 51 oder 52 unterschieden. Jeweils fünf der degenerierten Peptide wurden in Gemischen zusammengestellt (Anhang 7.2), *in vitro* in Gegenwart von AcCoA und p300 acetyliert und mittels MALDI TOF MS analysiert. In den erhaltenen Spektren konnte aufgrund der durch eine Acetylierung bewirkten Massenverschiebung von + 42 Da unterschieden werden, welcher spezifische Aminosäureaustausch in der enzymatischen Acetylierungsreaktion von Lysin 50 durch p300 tolerierbar war bzw. welcher Austausch einen inhibierenden Effekt auf die Reaktion hatte.

Abb. 5.5A zeigt exemplarisch das MALDI TOF MS Spektrum des Gemisches von Peptiden, in denen Arginin 49 gegen Threonin, Leucin, Glutamin, Histidin und Tyrosin ausgetauscht wurde. Wie erwartet wurden nach Inkubation des Peptidgemisches mit AcCoA und p300 aufgrund der nichtquantitativen Reaktion die unmodifizierten Peptide bei m/z 1107, 1119, 1134, 1143 und 1169 detektiert. Zusätzlich konnte zu jedem dieser Signale das um jeweils + 42 Da verschobene Signal bei m/z 1149, 1161, 1176, 1185 und 1211 beobachtet werden (Abb. 5.5A, oberes Spektrum). Diese Massenverschiebung erfolgte nicht nach Inkubation des Peptidgemisches mit AcCoA allein in Abwesenheit von p300 zur negativen Kontrolle (Abb. 5.5A, unteres Spektrum).

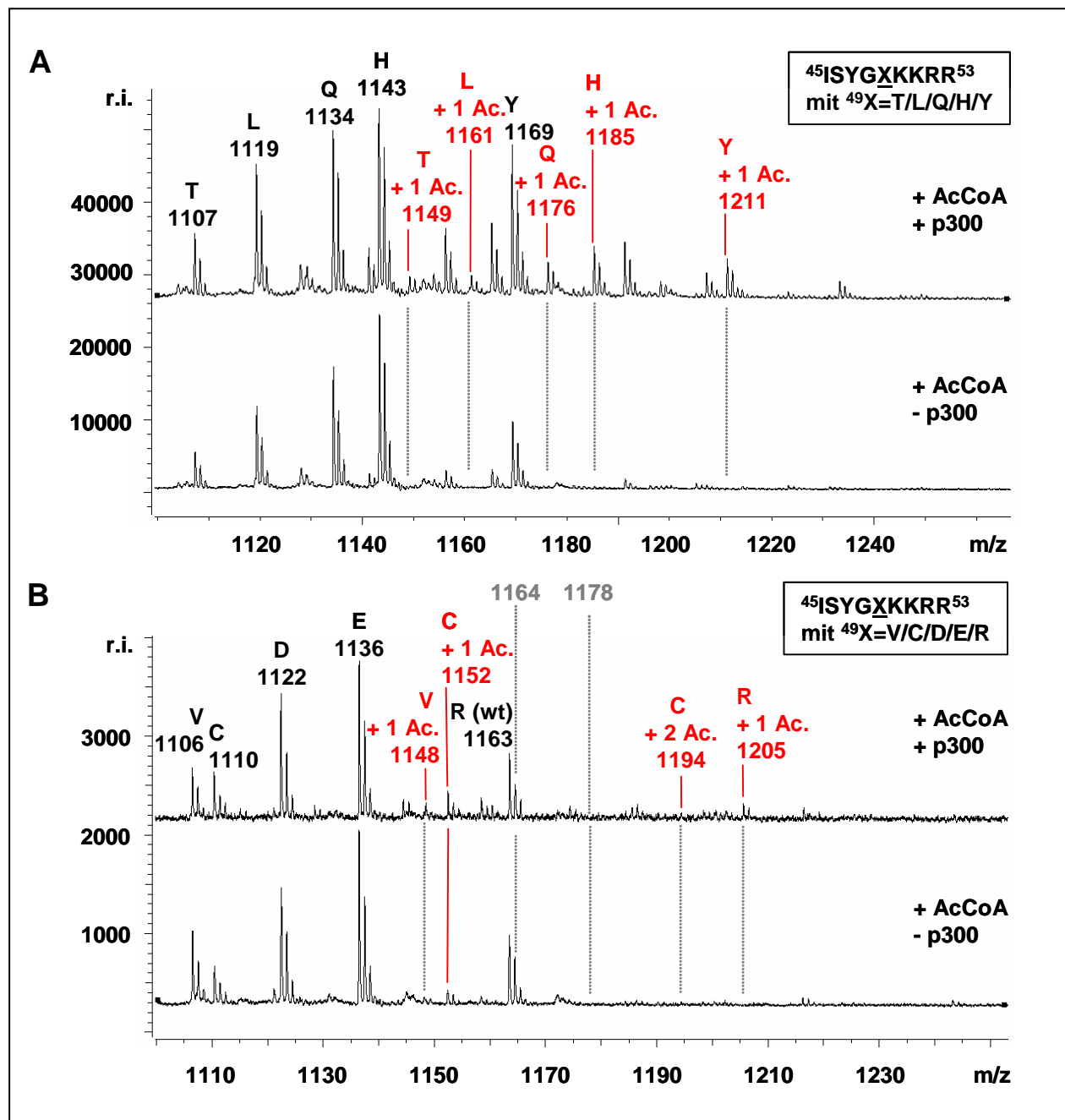


Abb. 5.5: Die umgebende Peptidsequenz hat Einfluss auf die Acetylierung von Lysin 50 durch p300. MALDI TOF MS Analyse von *in vitro* acetylierten Tat ARM Peptiden ISYGXKKRR (Aminosäuren 45-53) mit Arginin 49 Mutation. A: Mutation von Arginin 49 zu Threonin, Leucin, Glutamin, Histidin und Tyrosin. Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurden neben den Signalen der unmodifizierten Peptide bei m/z 1107, 1119, 1134, 1143 und 1169 die Signale der einfach acetylierten Peptide bei m/z 1149, 1161, 1176, 1185 und 1211 detektiert (rote Markierung). Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden keine zusätzlichen Signale detektiert (gepunktete Markierung). B: Mutation von Arginin 49 zu Valin, Cystein, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurde eine Massenverschiebung von + 42 Da nur für die Peptide detektiert, in denen Arginin 49 durch Valin und Cystein ersetzt wurde. Ihre Signale verschieben sich von m/z 1106 auf 1138 und von m/z 1110 auf 1152 (rote Markierung). Das Cysteinpeptid zeigte eine zusätzliche Signalverschiebung um + 42 Da auf m/z 1194 durch die nichtenzymatische Acetylierung des eingeführten Cysteinrestes (siehe Ergebnisse 5.4). Keine um + 42 Da verschobenen Signale wurden detektiert für die Peptide, in denen Arginin 49 durch Asparaginsäure und Glutaminsäure ersetzt wurde (gepunktete Markierung). Das analysierte Peptidgemisch enthielt zusätzlich das Peptid der Wildtypsequenz, dessen Signal bei m/z 1163 durch Acetylierung auf m/z 1205 verschoben wurde. Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurde zusätzlich zu den Signalen der unmodifizierten Peptide das Signal des nichtenzymatisch acetylierten Cysteinpeptids bei m/z 1152 detektiert (rote Markierung, siehe Ergebnisse 5.4).

Die spezifische Acetylierung von Lysin 50 durch p300 wurde somit nicht durch den Austausch des vorangehenden Arginin 49 durch Threonin, Leucin, Histidin, Glutamin oder Tyrosin beeinflusst. Dagegen führte der Austausch durch Asparaginsäure oder Glutaminsäure zur Inhibierung der enzymatischen Reaktion. Wie in Abb. 5.5B ersichtlich, ist nach *in vitro* Acetylierung der Peptide, in denen Arginin 49 gegen Valin, Cystein, Asparaginsäure und Glutaminsäure ausgetauscht wurde, die charakteristische Massenverschiebung von + 42 Da ausschließlichs für die Valin- und die Cysteinmutante zu beobachten (Abb. 5.5B, oberes Spektrum). Das Signal des Valinpeptids verschiebt sich dabei von m/z 1106 auf m/z 1148 und das Signal des Cysteinpeptids von m/z 1110 auf m/z 1152. Weiterhin enthielt dieses Peptidgemisch das Arginin 49 Peptid der Wildtypsequenz, dessen Signal sich ebenfalls wie erwartet von m/z 1163 auf m/z 1205 verschob. Dagegen konnte für die Signale der Peptide, die Asparaginsäure oder Glutaminsäure in Position 49 enthielten, keine Verschiebung von m/z 1122 auf m/z 1164 und von m/z 1136 auf m/z 1178 beobachtet werden. Überraschend zeigte sich jedoch bei m/z 1194 das zusätzliche Signal der zweifach acetylierten Cysteinmutante. Wie im folgenden unter 5.4 erläutert, beruht dieser p300 unabhängige Transfer einer Acetylgruppe auf das Peptid auf einer nichtenzymatischen Acetylierung des eingeführten Cysteinrestes. Somit ist nach Inkubation der Cysteinmutante mit AcCoA in Gegenwart von p300 eine der Massenverschiebungen von + 42 Da auf die nichtenzymatische Acetylierung von Cystein 49 und eine auf die enzymatische Acetylierung von Lysin 50 zurückzuführen. Die nichtenzymatische Cystein-Acetylierung erklärt auch das bei m/z 1152 erscheinende Signal der einfach acetylierten Cysteinmutante in der Negativkontrolle, die mit AcCoA in Abwesenheit von p300 inkubiert wurde und wie erwartet keine Signale für die acetylierten Valin-, Asparaginsäure-, Glutaminsäure- und Argininmutanten aufwies (Abb. 5.5B, unteres Spektrum).

In Zusammenfassung ergab die umfassende MALDI TOF MS Analyse der verschiedenen *in vitro* acetylierten Peptidgemische, dass ausschließlich der Ersatz von Glycin 48 oder Arginin 49 durch Asparaginsäure oder Glutaminsäure einen inhibierenden Effekt auf die Acetylierung von Lysin 50 durch p300 hatte. Sowohl der Austausch durch andere Aminosäuren an diesen Positionen als auch der Austausch von Serin 46, Lysin 51 oder Arginin 52 durch Asparaginsäure, Glutaminsäure oder eine andere Aminosäure erwies sich als tolerierbar für die enzymatische Wirkung von p300.

Der Einfluss von sauren Resten auf die enzymatische Acetylierung von Lysin 50 durch p300 wurde zusätzlich überprüft anhand der *in vitro* Acetylierung der einzelnen degenerierten Tat ARM Peptide, die in Position 47, 48, 49 oder 52 Asparaginsäure oder Glutaminsäure enthielten. Als positive Kontrolle dienten hierbei Peptide, die an der jeweiligen Austauschposition die ungeladene Aminosäure Alanin trugen. Abb. 5.6 zeigt exemplarisch die MALDI TOF MS

Spektren der alanin- und der glutaminsäurehaltigen Peptide. Wie erwartet wurden für die Alaninmutanten nach Inkubation mit AcCoA und p300 neben den Signalen der unmodifizierten Peptide bei m/z 1072, 1178, 1079 und 1079 die Signale der acetylierten Peptide bei m/z 1114, 1220, 1121 und 1121 detektiert (Abb. 5.6A, B, C und D, linke Spalte, jeweils oberes Spektrum). In den Negativkontrollen, die mit AcCoA in Abwesenheit von p300 inkubiert wurden, traten keine zusätzlichen Signale auf (Abb. 5.6A, B, C und D, linke Spalte, jeweils unteres Spektrum). Dagegen konnten in den MALDI TOF MS Spektren der Peptide, bei denen Glycin 48 oder Arginin 49 gegen eine saure Aminosäure ausgetauscht wurde, neben den unmodifizierten Peptiden bei m/z 1235 und m/z 1137 keine Signale der acetylierten Peptide bei m/z 1277 oder m/z 1179 detektiert werden, weder nach Inkubation mit AcCoA und p300 noch mit AcCoA allein (Abb. 5.6B und C, rechte Spalte). Der inhibierende Einfluss von Asparaginsäure und Glutaminsäure auf die enzymatische Acetylierung von Lysin 50 durch p300 bestätigte sich folglich für den Austausch von Glycin 48 oder Arginin 49 der Tat Wildtypsequenz, wohingegen der Ersatz von Tyrosin 47 oder Arginin 52 durch Asparaginsäure oder Glutaminsäure bei der Acetylierung von Lysin 50 durch p300 toleriert wurde. In den MALDI TOF MS Spektren dieser Peptide konnten nach Inkubation mit AcCoA und p300 zusätzlich zu den unmodifizierten Signalen bei m/z 1129 und m/z 1137 die acetylierten Peptide bei m/z 1171 und m/z 1179 beobachtet werden (Abb. 5.6A und D, rechte Spalte, jeweils oberes Spektrum), nicht aber in den jeweiligen Negativkontrollen (Abb. 5.6A und D, rechte Spalte, jeweils unteres Spektrum). Insgesamt beschränkte sich somit der Einfluss der umgebenden Peptidsequenz auf die enzymatische Acetylierung von Lysin 50 durch p300 auf die Positionen Lys-1 und Lys-2 von der Acetylierungsstelle und dort auf den Austausch der Aminosäuren Glycin und Arginin der Tat Wildtypsequenz durch die sauren Aminosäuren Asparaginsäure oder Glutaminsäure.

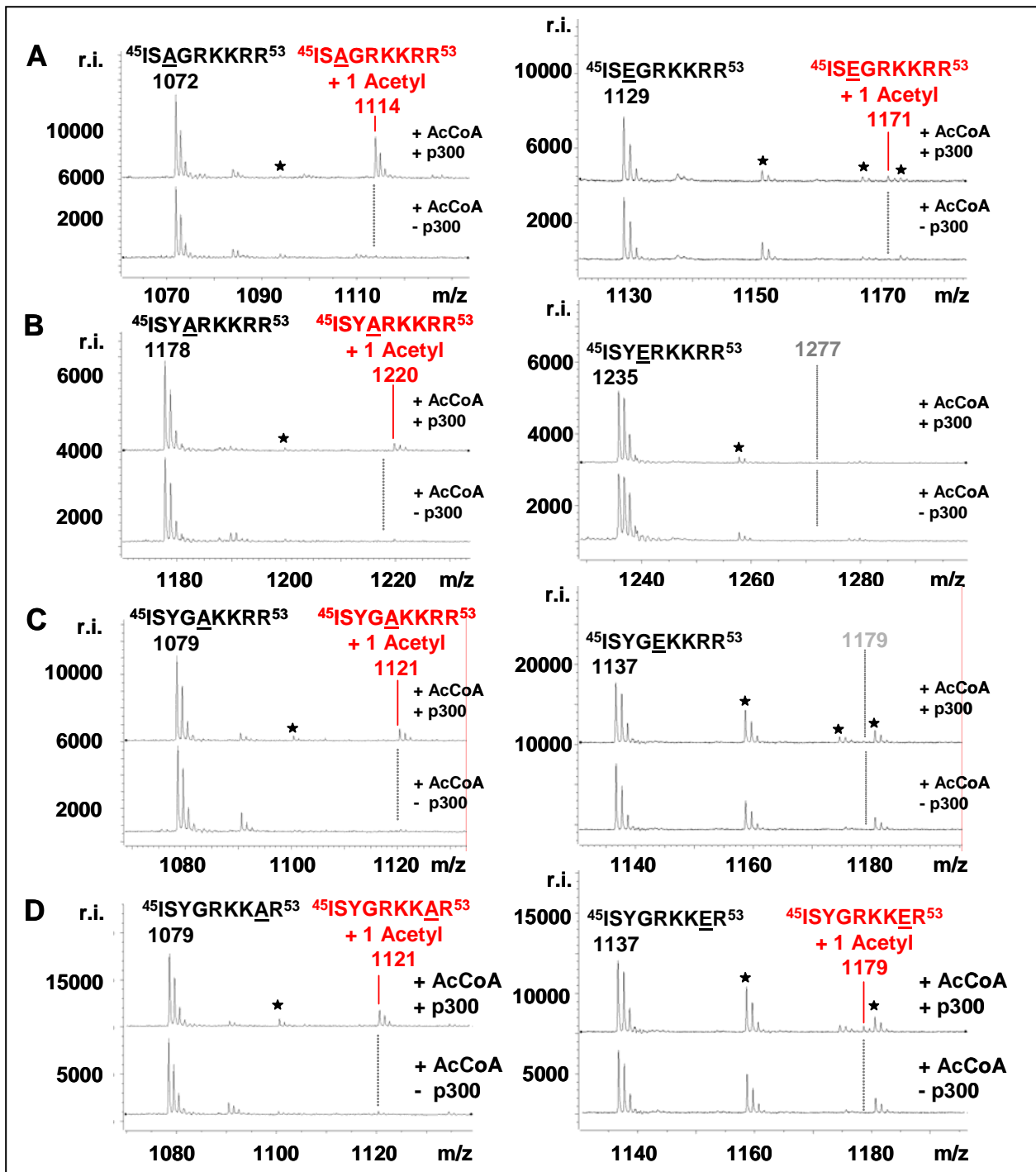


Abb. 5.6: Saure Aminosäurereste in Position Lys-2 und Lys-1 inhibieren die Acetylierung von Lysin 50 im durch p300. MALDI TOF MS Analyse von *in vitro* acetylierten Tat ARM Peptiden (Aminosäuren 45-53) mit Alanin- und Glutaminsäuremutation in den Positionen Lys-3, Lys-2, Lys-1 und Lys+2. Rechte Spalte: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurden für die Peptide, in denen Tyrosin 47 (A) oder Arginin 52 (D) durch Glutaminsäure ersetzt wurde, neben den Signalen der unmodifizierten Peptide bei m/z 1129 und 1137 die Signale der einfach acetylierten Peptide bei m/z 1171 und 1179 detektiert (obere Spektren, rote Markierung). Für die Peptide, in denen Glycin 48 (B) oder Arginin 49 (C) durch Glutaminsäure ersetzt wurde, wurden neben den Signalen der unmodifizierten Peptide bei m/z 1235 und 1137 keine zusätzlichen Signale detektiert (obere Spektren, gepunktete Markierung). Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden für keines der Mutationspeptide zusätzliche Signale detektiert (A-D, untere Spektren, gepunktete Markierung). Linke Spalte: Für Peptide, in denen Tyrosin 47 (A), Glycin 48 (B), Arginin 49 (C) oder Arginin 52 (D) gegen Alanin ausgetauscht wurde, wurden nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 neben den Signalen der unmodifizierten Peptide bei m/z 1072, 1178, 1079 und 1079 die Signale der einfach acetylierten Signale bei m/z 1072, 1178, 1121 und 1121 detektiert (obere Spektren, rote Markierung). Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden für keines der Mutationspeptide zusätzliche Signale detektiert (A-D, untere Spektren, gepunktete Markierung). ★Natriumaddukte

5.1.4 Einfluss von sauren Aminosäureresten auf die transkriptionelle Transaktivität von Tat

Um den Einfluss dieser Positionen auf die Tat Funktion *in vivo* zu untersuchen, wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese des vollständigen Tat Proteins das Glycin 48 durch Asparaginsäure und Glutaminsäure ersetzt, die beide wie unter 5.1.3 beschrieben eine *in vitro* Acetylierung von Lysin 50 im Tat ARM verhinderten. Als Positivkontrolle erfolgte der Austausch von Glycin 48 durch Alanin, welcher auf Peptidebene keine Auswirkungen auf die Lysin 50 Acetylierung gezeigt hatte. Diese Tat Mutanten wurden neben dem Wildtypprotein in transienten Transfektionsstudien von 1G5 Zellen verwendet, in deren Genom der HIV-1 Promotor sowie ein Luciferase Reporter gen stabil integriert wurden. Sie zeigen eine niedrige basale Promotor Aktivität, sind aber stark durch Tat aktivierbar und generieren vom Promotor angetrieben die Expression des Luciferaseenzym.

Wie erwartet zeigte sich nach Transfektion mit dem Tat Wildtypvektor eine konzentrationsabhängige Zunahme der Luciferase Aktivität gegenüber dem basalen Niveau (Abb. 5.7, weiße Balken).

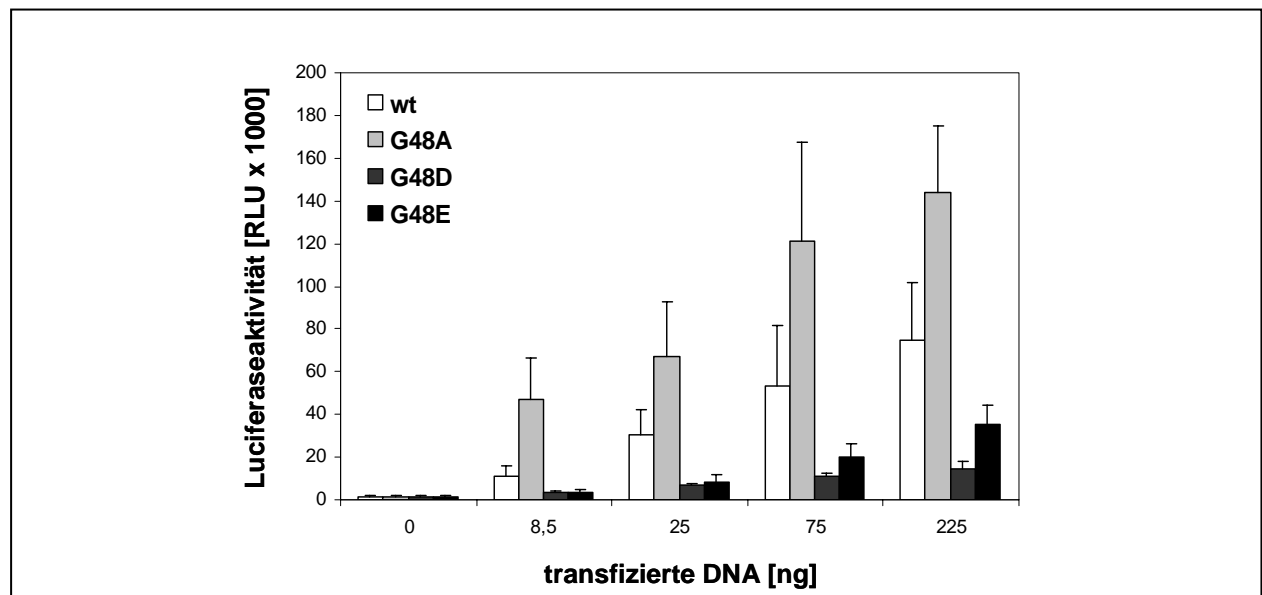


Abb. 5.7: Saure Aminosäurereste in Position 48 im Tat ARM erniedrigen die transkriptionelle Transaktivität von Tat. Transiente Transfektion von 1G5 Zellen, die in ihrem Genom stabil integriert den HIV-1 Promotor sowie ein Luciferase Reporter gen enthalten, mit verschiedenen Konzentrationen von Tat Wildtypvektor und von Tat Mutantenvektoren, in denen Glycin 48 gegen Alanin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure ausgetauscht wurde. Die Bestimmung der Tat Transaktivität erfolgte durch Quantifizierung der Luciferaseaktivität. Das Tat Wildtypprotein und die Tat Alaninmutante zeigten eine konzentrationsabhängige gesteigerte Tat Transaktivität gegenüber dem basalen Niveau (weiße und graue Balken). Die Tat Asparaginsäure- und Glutaminsäuremutanten zeigten in allen Konzentrationen eine stark erniedrigte Transaktivität im Vergleich zum Wildtypprotein (dunkelgraue und schwarze Balken).

Interessanterweise verstärkte sich diese Zunahme der Luciferaseaktivität nach Transfektion mit dem Alaninmutantenvektor zusätzlich 2-4fach gegenüber dem Wildtypprotein (Abb. 5.7, hellgraue Balken). Die Transfektionen der Asparaginsäure- und Glutaminsäuremutantenvektoren dagegen führten zu einer stark erniedrigten Luciferase Aktivität (Abb. 5.7, dunkelgraue und schwarze Balken). Daraus ließ sich schließen, dass die Positionen in Tat, deren Mutation zu sauren Aminosäureresten die *in vitro* Acetylierung von Tat ARM Peptiden verhinderten, auch *in vivo* relevant sind. Da die Lysin 50 Acetylierung für die transaktivierende Funktion von Tat notwendig ist, war anzunehmen, dass auch der beobachtete *in vivo* Effekt der Mutationen auf die Verhinderung dieser Acetylierung zurückzuführen ist.

Das für die Transfektionsstudien mutierte Glycin 48 liegt an der Schnittstelle zwischen der Kernregion und dem ARM von Tat. Diese beiden Regionen vermitteln die Bindung an die TAR RNA, die nukleäre Lokalisation des Tat Proteins und die Bindung von zellulären Cofaktoren wie Cyclin T1. Es musste daher ausgeschlossen werden, dass eine oder mehrere dieser Funktionen durch die eingeführten Mutationen gestört wurden.

Die Untersuchung des Einflusses der Mutationen auf die TAR Bindungsfähigkeit von Tat erfolgte unter Verwendung von *in vitro* synthetisierten ³⁵S-markierten Proteinen. Diese wurden mit aminoterminal biotinylierter TAR RNA, die an Streptavidin Sepharose Beads gekoppelt wurde, inkubiert. Der gebundene Anteil an Tat Wildtyp- oder Mutantenproteinen wurde nach mehreren sorgfältigen Waschschritten und anschließender SDS PAGE durch Autoradiographie detektiert. Abb. 5.8A stellt das Ergebnis für die Mutante, in der Glycin 48 durch Asparaginsäure ersetzt wurde, im Verhältnis zum Tat Wildtypprotein und der Mutante, in der Glycin 48 durch Alanin ersetzt wurde, dar. Es zeigte sich, dass die beiden Mutanten sogar stärker an die TAR RNA banden als das Wildtypprotein (Abb. 5.8A, mittlerer Gelausschnitt). Wie ersichtlich, wurden alle Proteine in gleicher Konzentration in den Experimenten eingesetzt. (Abb. 5.8A, oberer Gelausschnitt). In der Negativkontrolle, bei der die Inkubation mit den Streptavidin Sepharose Beads in Abwesenheit von TAR RNA erfolgte, konnten keine Banden detektiert werden (Abb. 5.8A, unterer Gelausschnitt), so dass die unspezifische Bindung der Proteine an den Streptavidin Sepharose Träger ausgeschlossen werden konnte. Damit ist es unwahrscheinlich, dass die für die Tat Funktion nötige Bindung der TAR RNA von der Mutation des Glycin 48 zu einem sauren Aminosäurerest negativ beeinflusst wird.

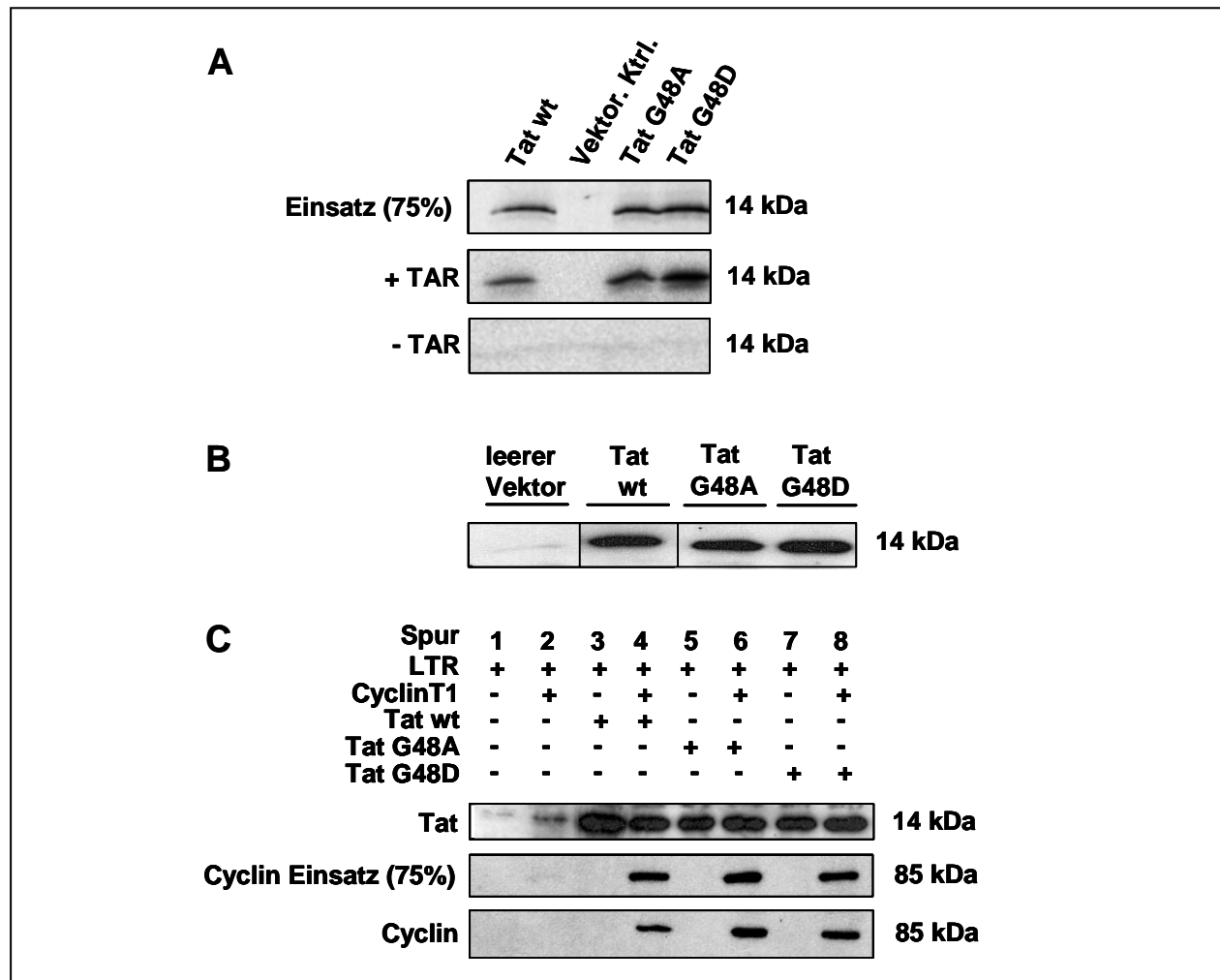


Abb. 5.8: Saure Aminosäurereste in Position 48 im Tat ARM haben keinen Einfluss auf die Bindung an TAR RNA, die nukleäre Lokalisation und die Cofaktorbindung von Tat. A: Bindung an TAR RNA. *In vitro* synthetisierte 35S-markiertes Tat Wildtypprotein und Tat Mutantenproteine, in den Glycin 48 gegen Alanin und Asparaginsäure ausgetauscht wurde, wurden mit an Streptavidin Sepharose immobilisierter biotinylierter TAR RNA inkubiert und der gebundene Anteil nach SDS PAGE durch Autoradiographie detektiert. Oberer Gelausschnitt: Quantifizierung der *in vitro* synthetisierten Proteine zum Beweis, dass äquivalente Proteinmengen in der TAR RNA Bindungsstudie eingesetzt wurden (Spuren 1, 3 und 4). Kein Protein wurde detektiert nach Einsatz des Leervektors in der *in vitro* Proteinsynthese (Spur 2). Mittlerer Gelausschnitt: Die Asparaginsäure- und Alaninmutanten von Tat banden stärker an die TAR RNA als das Wildtypprotein (vergleiche Spur 3 und 4 mit Spur 1). Unterer Gelausschnitt: Eine unspezifische Bindung der Proteine an den Streptavidin Sepharose Träger konnte durch Inkubation der Proteine mit Streptavidin Sepharose in Abwesenheit von TAR RNA ausgeschlossen werden. B: Nukleäre Lokalisation. Nukleäre Extraktion von Proteinen nach transienter Transfektion von Cos7 Primatenzellen mit Tat Wildtypprotein und Tat Mutantenproteine, in den Glycin 48 gegen Alanin und Asparaginsäure ausgetauscht wurde. Die Detektion der Tat Proteine erfolgte nach SDS PAGE mittels Western Blot Analyse. Die Asparaginsäure- und Alaninmutanten von Tat lagen in der nukleären Fraktion in gleicher Konzentration wie das Wildtypprotein vor (vergleiche Spur 3 und 4 mit Spur 2). Keine Expression konnte in der negativen Kontrolle, in der der leere Tatvektor transfiziert wurde, gefunden werden (Spur 1). C: Cofaktorbindung. Coimmunpräzipitation mit Cyclin T1 von Tat Wildtypprotein und Tat Mutantenproteine, in denen Glycin 48 gegen Alanin und Asparaginsäure ausgetauscht wurde, nach Cotransfektion von Cos7 Zellen mit entsprechenden Vektoren. Die Detektion erfolgte nach SDS PAGE mittels Western Blot Analysen. Oberer Gelausschnitt: Quantifizierung der Tat Proteine nach Immunpräzipitation zum Beweis, dass äquivalente Proteinmengen zur Bindung von Cyclin T1 zur Verfügung standen (Spuren 3-8). Kein Protein wurde detektiert nach Einsatz des Tat Leervektors in der Transfektion (Spuren 1 und 2). Mittlerer Gelausschnitt: Quantifizierung von Cyclin T1 nach der transienten Transfektion zum Beweis, dass Cyclin T1 in gleichbleibender Konzentration in den Zellen exprimiert wurde (Spuren 4, 6 und 8). Kein Protein wurde detektiert nach Einsatz des Tat Leervektors (Spuren 1 und 2) und nach Einsatz des Cyclin T1 Leervektors (Spuren 3, 5 und 7) in der Transfektion. Unterer Gelausschnitt: In der Coimmunpräzipitation entsprach die Bindungsstärke von Cyclin T1 an die Tat Mutantenproteine der Bindungsstärke an das Wildtypprotein (vergleiche Spuren 6 und 8 mit Spur 4). Unspezifische Proteinbindungen wurden durch Gebrauch der Tat und Cyclin T1 Leervektoren in der Transfektion ausgeschlossen (Spuren 1,2,3,5,7).

Zusätzlich wurde geprüft, ob die Tat Mutantenproteine im gleichen Maße im Zellkern verfügbar sind wie das Wildtypprotein. Dazu erfolgten transiente Transfektionen von Cos7 Primatenzellen, deren nukleäre Extrakte anschließend auf ihren Gehalt an Tat Wildtyp- und Mutantenproteinen getestet wurden. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS PAGE erfolgte die Detektion der Tat Proteine mittels Western Blot Analyse. Da die verwendeten Tat Proteine eine FLAG-Markierung trugen, wurde dazu ein FLAG-spezifischer Antikörper verwendet. Wie in Abb. 5.8B ersichtlich, lagen die Mutanten, in denen Glycin 48 durch Alanin und Asparaginsäure ersetzt wurde, in gleicher Konzentration wie das Wildtypprotein in der nukleären Fraktion vor (Abb.5.8B, Spur 2, 3 und 4). Keine Expression konnte in der negativen Kontrolle, in der der leere Tatvektor transfiziert wurde, gefunden werden (Abb.5.8B, Spur 1). Somit hat die Mutation von Glycin 48 in Tat zu einem sauren Aminosäurerest keine Auswirkung auf die Lokalisation und Konzentration des Proteins im Kern.

Um des weiteren die Interaktionsfähigkeit der Tat Mutanten mit dem Cofaktor Cyclin T1 zu überprüfen, wurden nach Cotransfektion von Cos7 Zellen das Tat Wildtypprotein sowie die Tat Mutanten mit Cyclin T1 coimmunpräzipitiert und die Menge an Tat gebundenem Cyclin T1 nach sorgfältigen Waschschritten und anschließender SDS PAGE mittels Western Blot Analysen detektiert. Die Überprüfung, ob die Tat Proteine nach der Coimmunpräzipitation in gleichmäßiger Konzentration vorlagen, erfolgte wiederum unter Verwendung des für die FLAG-Markierung der Proteine spezifischen Antikörpers (Abb. 5.8C, oberer Gelausschnitt). Der Cyclin T1 Cofaktor dagegen trägt eine HA-Markierung, und wurde mittels eines HA-spezifischen Antikörpers detektiert. Wie ersichtlich, lag das nach der transienten Transfektion exprimierte Cyclin T1 in gleichbleibender Konzentration in den Zellen vor (Abb. 5.8C, mittlerer Gelausschnitt). Nach der Coimmunpräzipitation zeigte sich, dass die Stärke der Bindung von Cyclin T1 an die Mutanten der Bindung an das Wildtypprotein entsprach oder diese sogar überstieg (Abb. 5.8C, unterer Gelausschnitt, vergleiche Spur 4 mit Spur 6 und 8). Somit hatte der Ersatz des Glycin 48 durch Alanin oder Asparaginsäure im Tat Protein keine störenden Auswirkungen auf die Bindung des Cofaktors Cyclin T1. Die Untersuchung der Tat Mutanten, in denen Glycin 48 gegen Glutaminsäure ausgetauscht wurde, erbrachte bezüglich aller drei Aspekte, der TAR Interaktion, der nukleären Lokalisation und der Cofaktorbindung, das gleiche Ergebnis (ohne Abb.).

Zusammenfassend wurde somit bewiesen, dass weder die Bindung von TAR RNA und Cyclin T1, noch die nukleäre Lokalisation und Konzentration des Tat Proteins durch die Mutation des Glycin 48 zu Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Alanin negativ beeinflusst wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass die dramatische Abnahme der Transaktivität der Tat Mutanten, in denen Glycin 48 durch Asparaginsäure oder Glutaminsäure ersetzt wurde, in der transienten

Transfektionstudie durch ihre inhibierende Wirkung auf die Acetylierung von Lysin 50 im Tat ARM bewirkt wurde.

5.2 Statistische Analyse von p300 Substraten

Obwohl die Zahl der bekannten Substrate von p300 in den letzten Jahren erheblich gestiegen ist, konnte bis heute keine allgemein gültige Konsensussequenz für die Lysin-Acetylierung durch p300 ermittelt werden. Auch die vorangehend beschriebene Analyse des Einflusses der umgebenden Peptidsequenz auf die Acetylierung von Lysin 50 ließ vermuten, dass die Reaktion eine hohe Toleranz gegenüber der die Acetylierungsstelle umgebenden Peptidsequenz zeigt. Um weitere Hinweise auf die allgemeinen Minimalanforderungen für die substratspezifische Wirkung von p300 zu sammeln, wurden die unter 2.1 ermittelten inhibierenden Tat ARM Sequenzen systematisch mit den Sequenzen der bisher bekannten Substrate von p300 verglichen. Die hierzu verwendete Substratliste umfasste 78 Einträge (Anhang 7.4), wobei eine Reihe von Proteinen an mehreren internen Lysinen von p300 acetyliert werden. Der Großteil der Substrate und ihre jeweiligen Acetylierungsstellen wurden mittels immunchemischer Methoden identifiziert.

5.2.1 p300 Substrate zeigen gleichartige Aminosäurehäufigkeiten

Nach Abgleich der Sequenzen der p300 Substrate wurde zunächst eine Matrix erstellt, die das Häufigkeitsprofil der einzelnen Aminosäuren an den acht Positionen amino- und carboxyterminal von der Acetylierungsstelle wiedergibt. Auch in dieser Matrix konnte kein wiederkehrendes Sequenzmotiv erkannt werden, da die Substrate in ihren Sequenzen sehr unterschiedlich sind. Ebenso ergab die computergestützte Analyse der Sekundärstrukturen der Regionen um die Acetylierungsstelle eine hohe Variabilität.

Die Suche nach einer Konsensussequenz erfolgte bisher ausschließlich auf dem absoluten Häufigkeitsprofil der einzelnen Aminosäuren unter Vernachlässigung ihres natürlichen Vorkommens in Proteinen. Im Vergleich der natürlichen und damit erwarteten Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren (Anhang 7.5) mit der Häufigkeit ihres tatsächlichen Vorkommens in p300 Substraten wiesen die Werte für bestimmte Aminosäuren jedoch signifikante Unterschiede auf. So besitzen beispielsweise Glycin und Arginin eine natürliche Häufigkeit von 7,4% und 4,2%, wohingegen sie in Position Lys-1 von der Acetylierungsstelle der bisher bekannten p300 Substraten ein erhöhtes Auftreten von 16,7% und 9,0% zeigen. Unter Einbeziehung der natürlichen Häufigkeit der Aminosäuren in die Kalkulation der Häufigkeitsprofile in p300

Substraten konnten folglich Aussagen über die Abweichung von der erwarteten Häufigkeit gemacht werden. Abb. 5.9 zeigt die graphische Darstellung dieser Abweichung für die Positionen Lys-4 bis Lys+4 von der Acetylierungsstelle in den 78 untersuchten p300 Substraten. Wie bereits erwähnt, zeigen Glycin und Arginin in Position Lys-1 eine um das 2,3fache bzw. 2,1fache erhöhte Häufigkeit gegenüber dem erwarteten Vorkommen. Prolin erscheint in den Positionen Lys-4 bis Lys-2 mit einer konstanten 2,3fach erhöhten Häufigkeit, erreicht diesen Wert in den Resten carboxyterminal von der Acetylierungsstelle jedoch nur in Position Lys+2. Besonders auffallend ist das vermehrte Auftreten von Lysin in sowohl aminoterminal in den Positionen Lys-4 und Lys-3 als auch in allen vier Positionen carboxyterminal von der Acetylierungsstelle. Die maximale Erhöhung erreicht es dabei an Position Lys-3, wo es mit 3,1facher Häufigkeit gefunden wird. Übertroffen wird dieser Wert allein von der Häufigkeit von Arginin in Position Lys+1, die einem 3,4fach verstärkten Auftreten entspricht. Auch in den Position Lys-4 bis Lys-1, Lys+2 und Lys+3 gehört Arginin zu den bevorzugten Aminosäuren, wohingegen es in Position Lys+4 mit einer um das 3,3fach verminderten Häufigkeit erscheint. Es ist somit wahrscheinlich, dass ein bestimmter Lysinrest eines Proteins durch p300 acetyliert wird, wenn sich die umgebende Sequenz aus einer Kombination der oben genannten Aminosäuren mit erhöhter Häufigkeit zusammensetzt. Wie die statistische Analyse der Sequenzen von p300 Substraten ergab, gilt dies in den acht Positionen direkt um die Acetylierungsstelle besonders für „Konsensuskombinationen“ aus folgenden Aminosäuren:

Lys-4	Lys-3	Lys-2	Lys-1	Lys+1	Lys+2	Lys+3	Lys+4	
K/P/S	K/P/R/W/G/A	P/G/S/R/K/M	G/R/P/A/K	^{ac} K	R/K/G	K/R/P	R/K/Y/G	K/E/A

Dagegen ist eine Acetylierung des Lysins durch p300 unwahrscheinlich, wenn die Sequenz ausschließlich Aminosäuren enthält, die in den p300 Substraten unterrepräsentiert vorlagen. Bemerkenswerterweise gehören zu der Gruppe der unterrepräsentierten Aminosäuren auf der aminoterminalen Seite der Acetylierungsstelle auch Asparaginsäure und Glutaminsäure, welche in der vorangehend unter 2.1 beschriebenen Studie in Position 48 und 49 des Tat ARM eine inhibierende Wirkung auf die Acetylierung von Lysin 50 zeigten. Auf der carboxyterminalen Seite treten sie mit relativ unveränderter Häufigkeit oder im Fall der Glutaminsäure sogar erhöhter Häufigkeit auf.

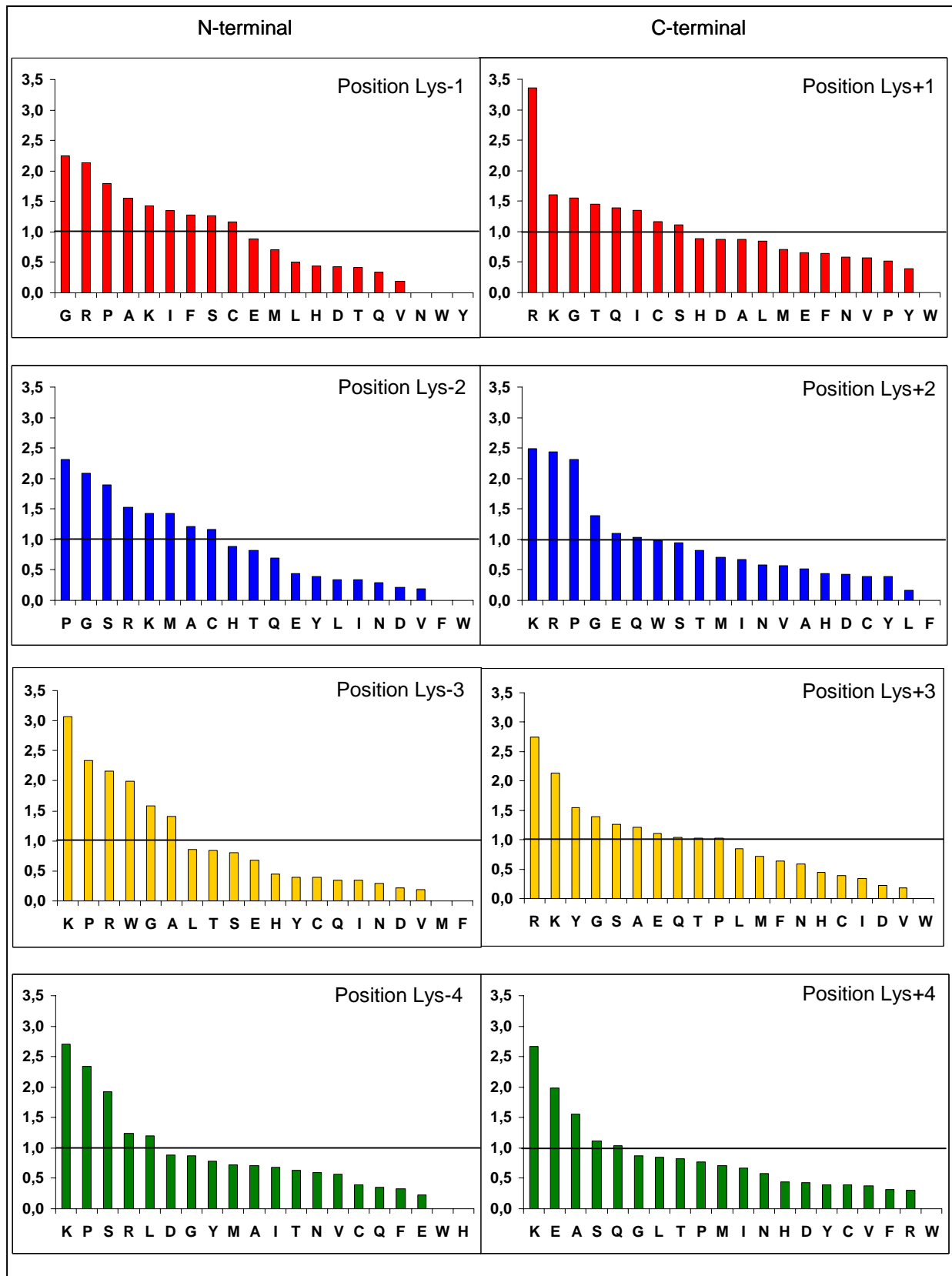


Abb. 5.9: p300 Substrate zeigen gleichartige Aminosäurehäufigkeiten in der die Acetylierungsstelle umgebenden Sequenz. Abweichung der Aminosäurehäufigkeiten in den Positionen Lys-4 bis Lys+4 um die Acetylierungsstelle in p300 Substraten von der natürlichen Aminosäurehäufigkeit. Die Gerade, die in Höhe des Wertes 1 der y-Achse liegt, entspricht der natürlichen Häufigkeit von proteinogenen Aminosäuren. Unter dieser Gerade liegende Werte entsprechen einem erniedrigten, über dieser Gerade liegende Werte einem vermehrten Vorkommen der jeweiligen Aminosäure in p300 Substraten. Die Zahlenwerte sind in Vielfachen der natürlichen Häufigkeit angegeben.

5.2.2 Erzeugung von p300 Acetylierungsstellen

Die erstellten Häufigkeitsprofile konnten zur Erklärung einer Reihe von Beobachtungen, die während der unter 5.1.3 beschriebenen Analyse der *in vitro* acetylierten Peptidgemische gemacht wurden, herangezogen werden. So konnte im MALDI TOF MS Spektrum des *in vitro* acetylierten Gemisches von Peptiden, deren Arginin 49 gegen Glycin, Alanin, Serin, Asparagin und Methionin ausgetauscht wurde, ein Signal bei m/z 1147 beobachtet werden (Abb. 5.10A, oberes Spektrum). Dieses Signal entspricht einer zweifachen Acetylierung des glycinhaltigen Peptides, welches auch in unmodifizierter Form (m/z 1063) und einfach acetylierter Form (m/z 1105) detektiert werden konnte. Basierend auf der in Abb. 5.9 dargestellten erhöhten Häufigkeit von Glycin in Position Lys-1 und Lys-2 von der Acetylierungsstelle in p300 Substraten war es wahrscheinlich, dass das eingeführte Glycin eine zusätzliche Acetylierung von Lysin 51 ermöglichte. Um diese Vermutung zu untermauern, erfolgten Synthese, *in vitro* Acetylierung und Endoproteinase Lys-C Verdau des Einzelpeptids $^{45}\text{ISYGGKRR}^{53}$, in dem das Arginin 49 der Tat Wildtypsequenz gegen Glycin ausgetauscht wurde. Wie aufgrund der nicht quantitativen Acetylierungsreaktion erwartet, zeigte sich in der MALDI TOF MS Analyse neben dem Signal des Spaltprodukts $^{45}\text{ISYGGK}^{51}$ bei m/z 752 das zugehörige Signal des an Lysin 50 acetylierten Produkts bei m/z 794 (Abb. 5.10B, oberes Spektrum). Da ein großer Teil des Peptids durch p300 acetyliert und von Lys-C carboxyterminal von Lysin 51 gespalten wurde, konnten die Signale des unmodifizierten vollständigen Peptids bei m/z 1063 und des zugehörigen einfach acetylierten Peptids bei m/z 1105 nur schwach detektiert werden. Trotz verlängerter Verdauzeiten und erhöhter Menge an eingesetzter Endoproteinase verringerte sich jedoch nicht die Intensität des Signals des zweifach acetylierten vollständigen Peptids. Somit konnte keine der Peptidbindungen carboxyterminal von Lysin 50 und 51 durch Lys-C gespalten werden, da beide vorangehend erfolgreich durch p300 acetyliert wurden. Diese Erzeugung einer zusätzlichen Acetylierungsstelle muss auf die Einführung des Glycinrestes in Position 49 zurückgeführt werden, da wie unter 5.1 erläutert für das Peptid der Wildtypsequenz keine zweifache Acetylierung beobachtet wurde (Abb. 5.1).

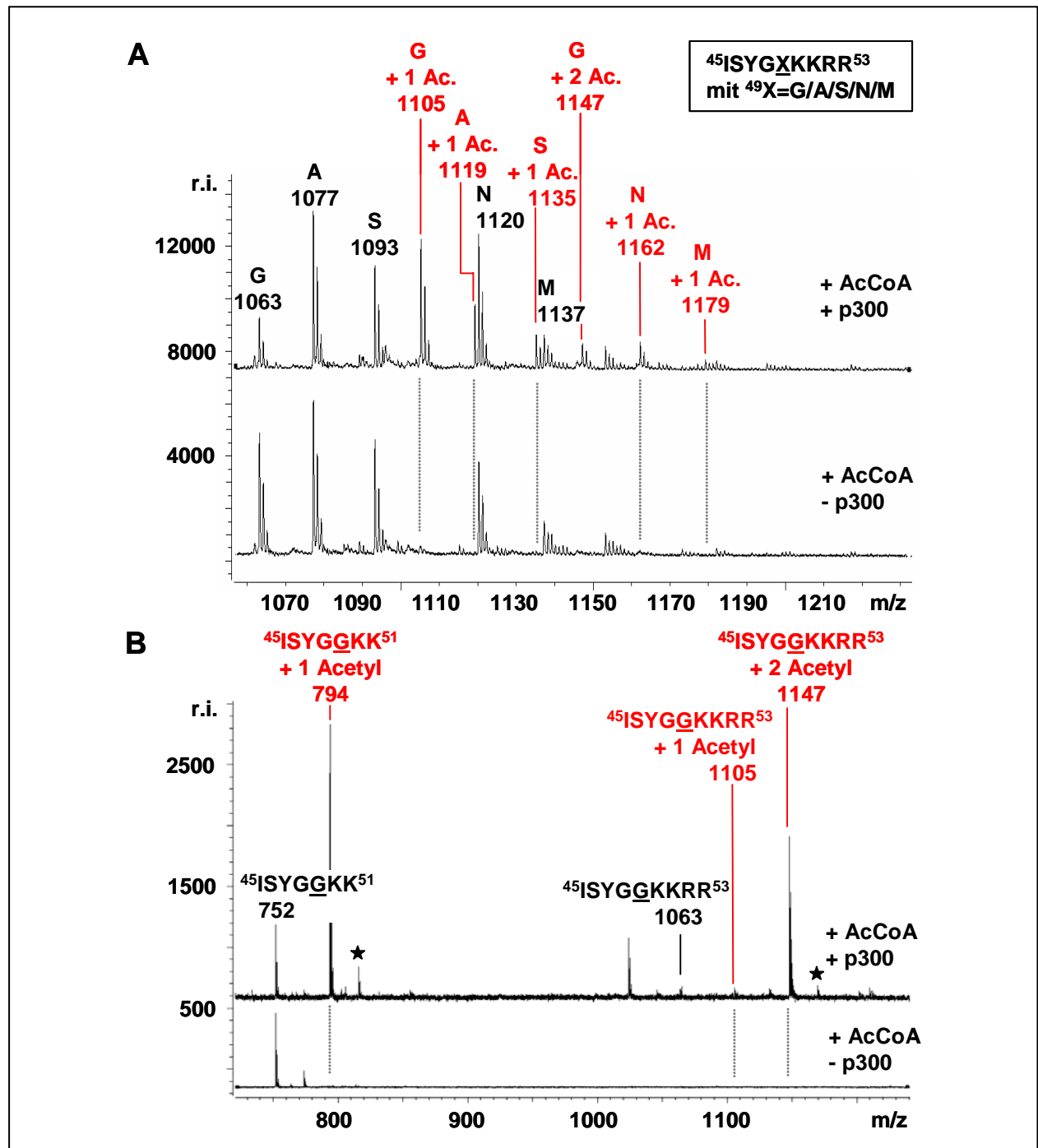


Abb. 5.10: Einführung eines Glycinrestes in Position 49 im Tat ARM ermöglicht die Acetylierung von 51 durch p300. A: MALDI TOF MS Analyse von *in vitro* acetylierten Tat ARM Mutantenpeptiden (Aminosäuren 45-53), in denen Arginin 49 durch Glycin, Alanin, Serin Asparagin und Methionin ersetzt wurde. Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurden neben den Signalen der unmodifizierten Peptide bei m/z 1063, 1077, 1093, 1120 und 1137 die Signale der einfach acetylierten Peptide bei m/z 1105, 1119, 1135, 1162 und 1179 detektiert (rote Markierung). Zusätzlich wurde das Signal des zweifach acetylierten glycinhaltigen Peptids bei m/z 1147 gefunden. Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden keine zusätzlichen Signale detektiert (gepunktete Markierung). B: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat Peptids ISYGGKRR (Aminosäuren 45-53), in dem Arginin 49 durch Glycin ersetzt wurde, nach Lys-C Verdau. A: Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 blieb die Intensität des Signals des zweifach acetylierten vollständigen Peptids bei m/z 1147 unabhängig von der Verdauzeit und der Menge an eingesetzter Proteinase gleich, da die Peptidbindungen auf der carboxyterminalen Seite von Lysin 50 und 51 durch enzymatische Acetylierung beider Lysinreste geschützt waren. Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden keine acetylierten Spaltprodukte detektiert (gepunktete Markierung). ★Natriumaddukte

Auch das MALDI TOF MS Spektrum des *in vitro* acetylierten Gemisches von Peptiden, deren Arginin 49 gegen Prolin, Isoleucin, Lysin, Phenylalanin und Tryptophan ausgetauscht wurde, wies eine zweifache Verschiebung eines Signals um jeweils + 42 Da auf. Hierbei handelte es sich um das Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1135, das Signal des einfach acetylierten Peptids bei m/z 1177 und des zweifach acetylierten Peptids bei m/z 1219 (Abb. 5.11A, oberes Spektrum). Diese Signale entsprechen der Tat ARM Mutante, in der Arginin 49 durch einen Lysinrest ersetzt und somit ein Triple Lysin Motiv erzeugt wurde. Der Vergleich der Peptidsequenz $^{49}\text{ISYG}\underline{\text{K}}\text{KKRR}^{53}$ mit den Aminosäurehäufigkeiten in p300 Substraten (Abb. 5.9) zeigt, dass ein zusätzlicher Lysinrest in Position Lys-2 von Lysin 51 durchaus die Acetylierung von Lysin 51 durch p300 ermöglicht. Andererseits trägt das Peptid in Position 48 und damit in Position Lys-1 von Lysin 49 einen Glycinrest, welcher die Wahrscheinlichkeit der Acetylierung des eingeführten Lysins 49 dramatisch erhöht. Folglich bestand für beide Lysine, 49 und 51, die Möglichkeit der spezifischen Acetylierung durch p300. Die somit erforderliche Identifizierung der zusätzlichen Acetylierungsstelle erfolgte wiederum durch Lys-C Verdau des *in vitro* acetylierten Einzelpeptids und MALDI TOF MS Analyse. Neben den erwarteten Signalen der unmodifizierten Spaltprodukte $^{45}\text{ISYGK}^{49}$ bei m/z 567 und $^{45}\text{ISYGKK}^{50}$ bei m/z 695 und des einfach an Lysin 50 acetylierten Peptids $^{45}\text{ISYGK}^{\text{ac}}\text{KK}^{51}$ bei m/z 865 wurden intensive Signale mit m/z 737 und m/z 907 detektiert (5.11B, oberes Spektrum). Diese Signale entsprechen dem einfach acetylierten Peptid $^{45}\text{ISYG}^{\text{ac}}\text{KK}^{50}$, welches durch Spaltung carboxyterminal von Lysin 50 erzeugt wurde, sowie dem zweifach acetylierten Peptid $^{45}\text{ISYG}^{\text{ac}}\text{K}^{\text{ac}}\text{KK}^{51}$, welches durch Spaltung carboxyterminal von Lysin 51 entstand. In diesen Peptiden müssen aufgrund der Spezifität von Lys-C für unmodifizierte Lysine die Lysine 50 bzw. 51 in nicht acetylierter Form vorliegen. Somit weisen beide Signale darauf hin, dass das an Position 49 eingeführte Lysin zusätzlich durch p300 acetyliert wurde.

Um zu beweisen, dass die beiden ersten Lysine des erzeugten Triple Lysin Motivs durch p300 acetyliert wurden, erfolgte die Aufnahme des Fragmentationenspektrums des doppelt acetylierten Peptids mit m/z 907 (Abb. 5.11C). Aufgrund der durchgängig detektierten Serie der y-Ionen konnte klar abgelesen werden, dass bereits das Lysin 49 eine Acetylgruppe trägt. Das bestätigte den bei der Untersuchung der Aminosäurehäufigkeiten in p300 Substraten unter 5.2.1 vermuteten starken positiven Einfluss eines Glycinrestes in Position Lys-1 auf die spezifische Acetylierung des nachfolgenden Lysins durch p300.

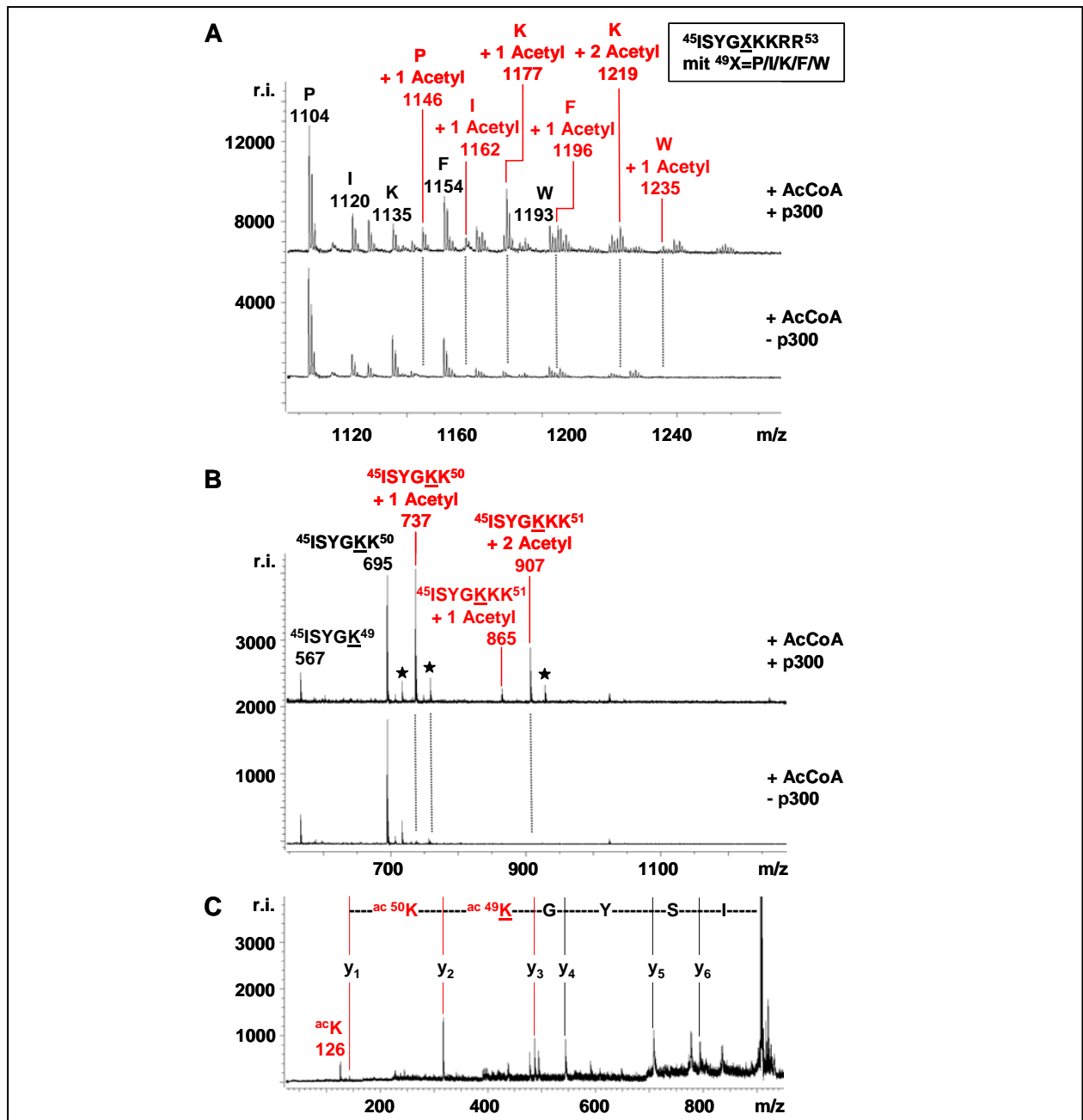


Abb. 5.11: Ein in Position 49 des Tat ARM eingeführter Lysinrest wird durch p300 acetyliert. A: MALDI TOF MS Analyse von *in vitro* acetylierten Tat ARM Mutantenpeptiden (Aminosäuren 45-53), in denen Arginin 49 durch Prolin, Isoleucin, Lysin, Phenylalanin und Tryptophan ersetzt wurde. Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurden neben den Signalen der unmodifizierten Peptide bei m/z 1104, 1120, 1135, 1154 und 1193 die Signale der einfach acetylierten Peptide bei m/z 1146, 1162, 1177, 1196 und 1235 detektiert (rote Markierung). Zusätzlich wurde das Signal des zweifach acetylierten lysinhaltigen Peptids bei m/z 1219 gefunden. Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden keine zusätzlichen Signale detektiert (gepunktete Markierung). B: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat Peptids ISYGKKKRR (Aminosäuren 45-53), in dem Arginin 49 durch Lysin ersetzt wurde, nach Lys-C Verdau. A: Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurden zwei zusätzliche Signale bei m/z 737 und 907 detektiert, welche auf die einfache enzymatische Acetylierung von Lysin 49 im Peptid ISYGacKK (Aminosäuren 45-50) und die zweifache enzymatische Acetylierung von Lysin 49 und Lysin 50 im Peptid ISYGacKacKK (Aminosäuren 45-51) hinweisen (rote Markierung). Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden keine acetylierten Spaltprodukte detektiert (gepunktete Markierung). ★Natriumaddukte C: MALDI TOF PSD Analyse des zweifach acetylierten Tat Peptids ISYGKKK (Aminosäuren 45-51) mit m/z 907, in dem Arginin 49 durch Lysin ersetzt wurde. Die detektierte Ionenserie enthält die Signale der y_2 - und y_3 -Ionen, die für die Acetylierung der Lysine 49 und 50 charakteristisch sind (rote Markierung). Das Signal bei m/z 126 entspricht einem Acetyl-Lysin spezifischen Markerion, welches zusätzlich zur y -Ionenserie zur Charakterisierung von acetylierten Peptiden herangezogen werden kann.

5.2.3 Datenbanksuche nach neuen p300 Substraten

Zur weiteren Untermauerung der Aussagekraft der unter 5.2.1 erstellten Häufigkeitsprofile wurden für jede der Positionen Lys-4 bis Lys-1 von der Acetylierungsstelle die drei häufigsten Aminosäuren zu hypothetischen p300 Substratsequenzen kombiniert. Mit den so erstellten kurzen Sequenzen erfolgten FASTS Datenbanksuchen nach Homologien in realen Proteinen, die damit potentielle neue p300 Substrate repräsentieren.

Interessanterweise umfassten die Ergebnisse der FASTS Suchen mit den hypothetischen Sequenzen KPGGK und SKSGK jeweils Sequenzen innerhalb des N-Terminus eines weiteren HIV-1 Proteins, des Gag Polyproteins. Die entsprechenden Peptide $^6\text{SVLSGKKADELEKVR}^{20}$ und $^{21}\text{LRPGGKKKYMLKHV}^{34}$ wurden chemisch synthetisiert, der *in vitro* Acetylierung in Gegenwart von AcCoA und p300 unterzogen und mittels MALDI TOF MS analysiert. Das Spektrum des Peptids $^6\text{SVLSGKKADELEKVR}^{20}$ zeigte neben dem Peptidsignal bei m/z 1659 und dem Signal des zugehörigen Natriumaddukts nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 ein zusätzliches Signal bei m/z 1701 (Abb. 5.12A, oberes Spektrum). Die Massenverschiebung entspricht + 42 Da und ist somit charakteristisch für eine einfache Acetylierung. Dieses zusätzliche Signal fehlte sowohl im Spektrum der in Abwesenheit von p300 durchgeführten Negativkontrolle (Abb. 5.12A, oberes Spektrum) als auch im Spektrum einer zusätzlichen Kontrolle, die in Gegenwart von AcCoA und der Acetyltransferase pCAF durchgeführt wurde (ohne Abb.). Folglich wurde das Peptid spezifisch durch p300 einfach acetyliert. Darüber hinausgehend konnte im Spektrum des Peptids $^{21}\text{LRPGGKKKYMLKHV}^{34}$ neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei 1655 eine zweifache Verschiebung um jeweils +42 Da zu m/z 1697 und m/z 1739 beobachtet werden (Abb. 5.12B, oberes Spektrum). Da die zusätzlichen Signale in keiner der beiden durchgeführten Kontrollen detektiert wurden, erfolgte auch die zweifache Acetylierung dieses Peptids durch eine p300-spezifische enzymatische Reaktion.

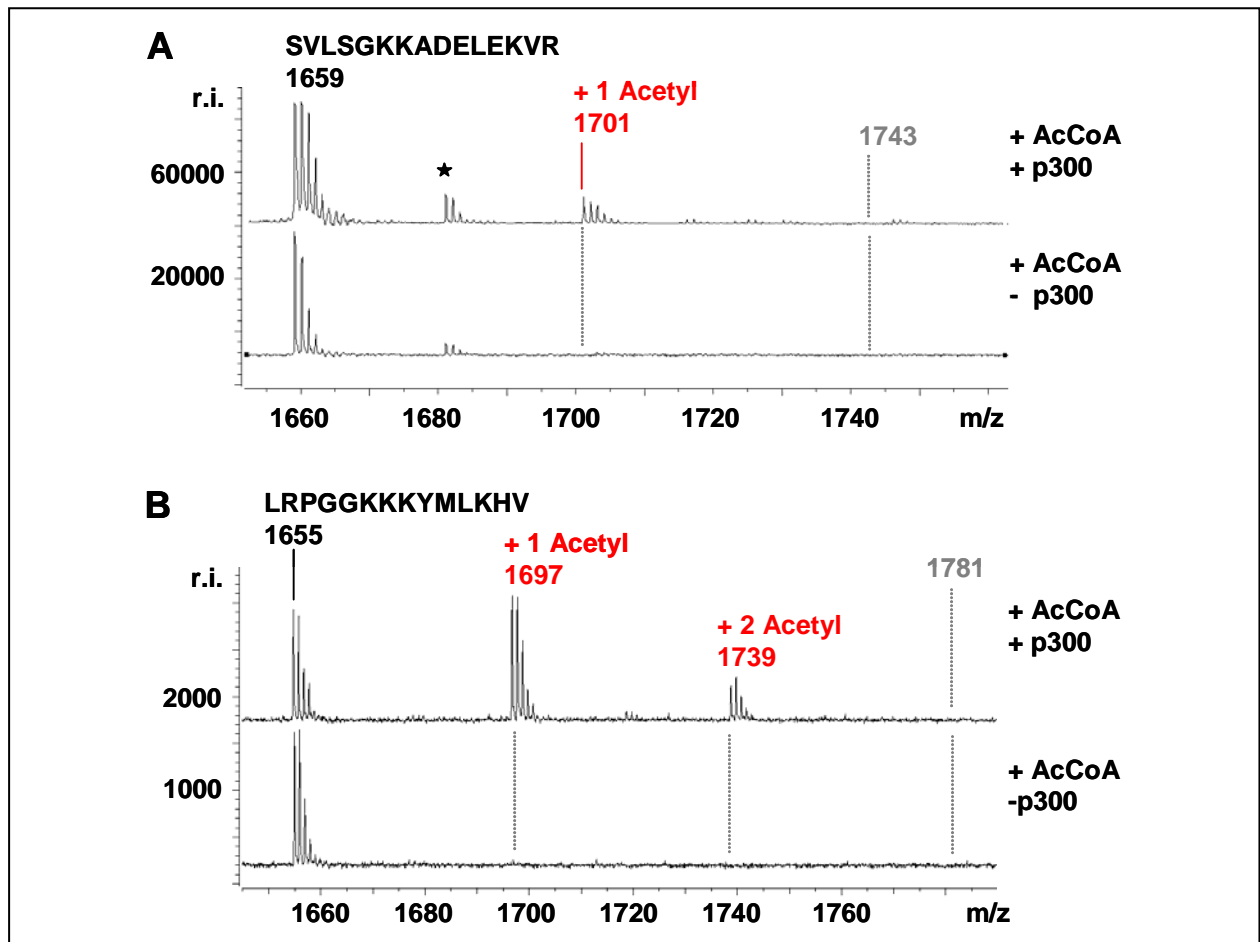


Abb. 5.12: Durch Proteindatenbanksuche mit hypothetischen p300 Substratsequenzen können neue Substrate von p300 identifiziert werden. Basierend auf den unter 5.2.1 erstellten „Konsensuskombinationen“ der Lysin-Acetylierung durch p300 wurden hypothetische p300 Substratsequenzen konstruiert und zur FASTS Proteindatenbanksuche verwendet. Zwei der gefundenen potentiellen p300 Substratpeptide wurden synthetisiert, in Gegenwart von p300 acetyliert und der massenspektrometrischen Analyse unterzogen. A: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Peptids SVLSGKKADELEKVR. Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurde neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1659 das Signal des einfach acetylierten Peptids bei m/z 1701 detektiert (rote Markierung). Kein Signal wurde gefunden für das zweifach acetylierte Peptid bei m/z 1743 (gepunktete Markierung). Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden keine zusätzlichen Signale detektiert (gepunktete Markierung). B: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Peptids LRPGGKKKYMLKHV. Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von p300 wurde neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1655 die Signale der einfach und zweifach acetylierten Peptide bei m/z 1697 und 1739 detektiert (rote Markierung). Kein Signal wurde gefunden für das dreifach acetylierte Peptid bei m/z 1781 (gepunktete Markierung). Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von p300 wurden keine zusätzlichen Signale detektiert (gepunktete Markierung). ★Natriumaddukte

Damit hatte die Erstellung der Häufigkeitsprofile der Aminosäuren in den bekannten p300 Substraten und die darauf basierende Konstruktion von hypothetischen Substratsequenzen zu einer erfolgreichen *in silico* Identifizierung von real vorkommenden Proteinen geführt, deren Peptide *in vitro* spezifisch durch p300 acetyliert werden.

5.3 Die enzymatische Acetylierung von HIV-1 Tat durch die pCAF Acetyltransferase

Kiernan et al. zufolge wird Lysin 28 in der Tat CRR von der Acetyltransferase pCAF acetyliert [Kiernan et al., 1999]. Da jedoch die bisher von uns durchgeführten immunchemischen Experimente diese Beobachtung nicht bestätigen konnten, wurde die Acetylierung von Tat durch pCAF zusätzlich mit Hilfe der unter 5.1 dargestellten Kombination von *in vitro* Acetylierung, MALDI TOF MS, Endoproteinase LysC Verdau und Edmann Abbau untersucht. Wie dort beschrieben erfolgte die Studie anhand von synthetischen Peptiden, die den verschiedenen Regionen des Tat Proteins entsprechen (Abb. 5.13), sowie an dem synthetischen vollständigen 1 Exon Tat Protein (Aminosäure 1-72).

5.3.1 pCAF acetyliert das ARM von Tat

Die sechs den verschiedenen Tat Regionen entsprechenden Peptide wurden parallel *in vitro* in der Gegenwart von AcCoA und pCAF acetyliert und anschließend nach Entsalzung und Konzentrierung mittels MALDI TOF MS analysiert.

Im MALDI TOF MS Spektrum des aminoterminalen Tat Peptids (¹MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTA²¹) konnte nach der *in vitro* Acetylierung in Gegenwart von AcCoA und pCAF ausschließlich das nichtacetylierte Peptid bei m/z 2400 in Begleitung des Natriumaddukts bei m/z 2422 detektiert werden (Abb. 5.13A, oberes Spektrum). Dieses Peptidmuster entsprach der in Abwesenheit von pCAF acetylierten negativen Kontrolle (Abb. 5.13A, unteres Spektrum) und weist aufgrund der fehlenden Signalverschiebung von + 42 Da darauf hin, dass keines der beiden Lysine in Position 12 und 19 des Tat N-Terminus einer enzymatischen Acetylierung durch pCAF erliegen. Das gleiche Resultat ergab sich für die in den Peptiden der Glutamin-reichen Region (⁶⁰PQGSQTHQVLSKQPTSQSRGDP⁸¹) und des C-Terminus (⁸²TGPKESKKKVERETETDPFD¹⁰¹) von Tat enthaltenen Lysine 71, 85, 88, 89, 90. Auch für diese beiden Peptide zeigte sich sowohl in dem MALDI TOF MS Spektrum der in Gegenwart von pCAF durchgeführten *in vitro* Acetylierung als auch in dem Spektrum der Negativkontrolle ausschließlich das Signal des nichtacetylierten Peptids bei m/z 2450 bzw. m/z 2321 in Begleitung der Natriumadduktssignale (Abb. 5.13 E und F). Eine für eine Acetylierung charakteristische Massenverschiebung von + 42 Da war in keinem der Spektren zu beobachten. Überraschend dagegen zeigte das der Tat CRR entsprechende Peptid ²²CTNCYCKKCCFHCQ³⁵ bereits nach der Inkubation mit AcCoA allein in Abwesenheit von pCAF eine derart starke mehrfache Acetylierung, dass das Signal für das nichtacetylierte Peptid bei m/z 1683 bei der MALDI TOF MS Analyse nur noch sehr schwach detektierbar war (Abb. 5.13B, unteres

Spektrum). Gegenüber diesem schwachen Signal des unmodifizierten Peptids konnten drei deutliche um jeweils + 42 Da verschobene Peptidsignale bei m/z 1725, 1767 und 1809 sowie ein schwaches viertes Signal bei m/z 1851 gefunden werden, obwohl diese Region nur zwei Lysine an Position 28 und 29 enthält. Alle Peptidsignale wurden von den Signalen ihrer jeweiligen Natriumaddukte begleitet. Interessanterweise hatte die Zugabe von pCAF zum *in vitro* Acetylierungsansatz keine Auswirkung auf das im MALDI TOF MS Spektrum beobachtete Peptidmuster. Die nach Inkubation mit AcCoA und pCAF detektierten Signale des Peptids entsprachen den Signalen der Negativkontrolle sowohl in der Anzahl der für Acetylgruppen charakteristischen Massenverschiebungen als auch in der Intensität der einzelnen Signale (Abb. 5.13B, oberes Spektrum). Es musste somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei der mehrfachen Acetylierung des Tat CRR Peptids um einen enzymunabhängigen Transfer von mindestens drei Acetylgruppen von AcCoA auf das CRR Peptid handelte. Die fehlende Detektion einer zusätzlichen oder stärkeren Acetylierung nach Zugabe von pCAF zum Acetylierungsansatz wies darauf hin, dass keines der beiden Lysine 28 und 29 spezifisch von pCAF acetyliert wurde. Jedoch bedurfte es aufgrund der abnehmenden Absolutmenge an vier- und mehrfach acetylierten Peptiden in Kombination mit der limitierten Sensitivität des MALDI TOF Massenspektrometers und der möglichen gegenseitigen Suppression der Signale einer eingehenderen Untersuchung der enzymatischen Lysinacetylierung der Tat CRR. Da die Anzahl an Acetylierungen die Anzahl der im Peptid enthaltenen Lysinreste überstieg, musste geschlossen werden, dass in diesem Peptid neben den ϵ -Aminogruppen der Lysine zusätzliche Aminosäurereste an der Bindung von Acetylgruppen beteiligt waren. Eine detaillierte Analyse des Verhaltens dieser Tat Region in *in vitro* Acetylierungen erfolgte deshalb anhand einer Reihe von Peptidmutanten und ist im Anschluss unter 5.4 beschrieben.

Auch die MALDI TOF MS Analyse des der Tat Kernregion entsprechenden Peptids $^{35}\text{VCFITKALGISYG}^{48}$ ergab eine unerwartete enzymunabhängige Acetylierung. Bereits nach der in Abwesenheit von pCAF durchgeführten *in vitro* Acetylierung konnte neben dem Signal des nichtacetylierten Peptids bei m/z 1500 und dem zugehörigen Natriumaddukt signal das für eine einfache Peptidacetylierung charakteristische Signal bei m/z 1542 detektiert werden (Abb. 5.13C, unteres Spektrum). Eine weitere Massenverschiebung des Signals um + 42 Da wurde auch nach Anwesenheit von pCAF im Acetylierungsansatz nicht beobachtet, (Abb. 5.13C, oberes Spektrum). Wie bereits für die Tat CRR angenommen, muss es sich bei dieser Peptidacetylierung um eine pCAF unabhängige Übertragung der Acetylgruppe auf das Peptid handeln. Ob das in der Tat Kernregion sitzende Lysin 41 in diese Transferreaktion oder eine zusätzliche Acetylierung des Peptids durch pCAF involviert ist wurde wie unter 5.4.5 beschrieben gesondert untersucht.

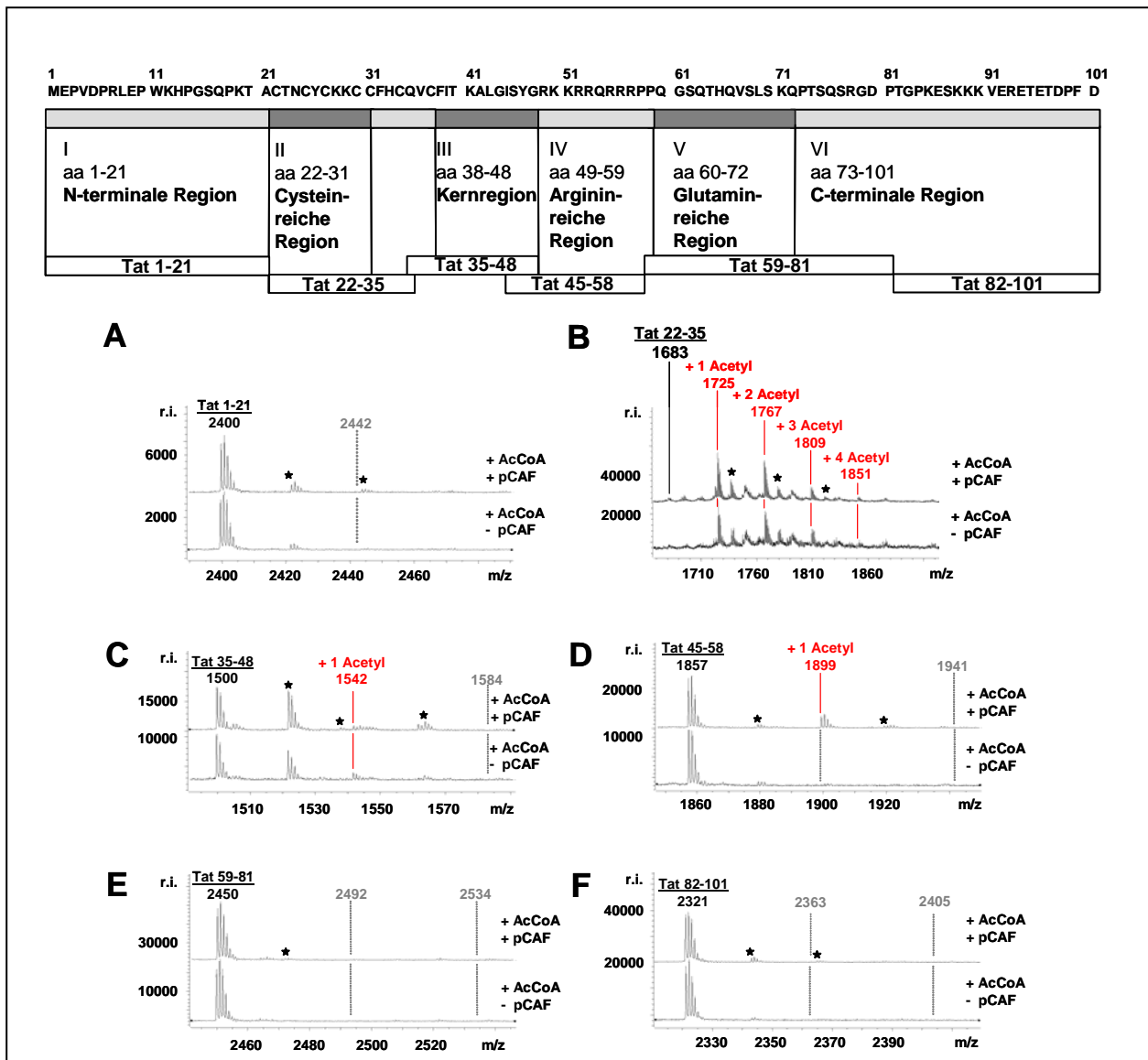


Abb. 5.13: pCAF acetyliert das ARM von Tat und die CRR und Kernregion von Tat werden nichtenzymatisch acetyliert. Sechs Peptide, die wie im oberen Schema dargestellt den verschiedenen Tat Regionen entsprechen, wurden in Gegenwart von pCAF acetyliert und der massenspektrometrischen Analyse unterzogen. A, E, F: MALDI TOF MS Analysen der *in vitro* acetylierten Peptide, die den Aminosäuresequenzen 1-21, 59-81 und 82-101 von Tat entsprechen. Unabhängig von der Gegenwart von pCAF bei der Inkubation mit AcCoA konnten neben den Signalen der unmodifizierten Peptide bei m/z 2400, 1857 und 2321 keine auf eine Acetylierung hinweisenden zusätzlichen Signale detektiert werden (gepunktete Markierung). B: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat CRR Peptids CTNCYCKKCFHCQ (Aminosäuren 22-35). Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF wurden neben dem schwachen Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1683 vier um jeweils + 42 Da verschobene zusätzliche Signale bei m/z 1725, 1767, 1809 und 1851 detektiert (rote Markierung). Unteres Spektrum: Auch nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von pCAF wurden neben dem Signal des unmodifizierten Peptids die vier um jeweils + 42 Da verschobenen zusätzlichen Signale detektiert (rote Markierung), was auf einen enzymunabhängigen Transfer von mindestens vier Acetylgruppen auf das Peptid hinwies. C: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat Kernregionpeptids QVCFITKALGISYG (Aminosäuren 35-48). Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF wurde neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1500 ein zusätzliches Signal bei m/z 1542 detektiert (rote Markierung). Unteres Spektrum: Auch nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von pCAF wurden die Signale des unmodifizierten und des einfach acetylierten Peptids detektiert (rote Markierung), was auf einen enzymunabhängigen Transfer der Acetylgruppe auf das Peptid hinwies. D: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat ARM Peptids ISYGRKKRRQRRRP (Aminosäuren 45-58). Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF wurde neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1857 das Signal des einfach acetylierten Peptids bei m/z 1899 detektiert (rote Markierung). Kein Signal wurde gefunden für das zweifach acetylierte Peptid bei m/z 1941 (gepunktete Markierung). Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von pCAF wurden keine zusätzlichen Signale detektiert (gepunktete Markierung), was auf eine enzymatische Acetylierung des Peptids durch pCAF hinwies. ★ Natriumaddukte

Das MALDI TOF MS Spektrum des dem Tat ARM Region entsprechenden Peptids $^{45}\text{ISYGRKKRRQRRRP}^{58}$ zeigte parallel zum unter 5.1 verwendeten kurzen ARM Peptid in der negativen Kontrolle keine Verschiebung des Peptidsignals bei m/z 1857 (Abb. 5.13D, unteres Spektrum). Nach Inkubation des ARM Peptids mit AcCoA in Gegenwart von pCAF jedoch wurde ein zweites Signal bei m/z 1899 einschließlich des zugehörigen Natriumadduktsignals bei m/z 1941 detektiert (Abb. 5.13D, oberes Spektrum). Eine weitere Massenverschiebung des Signals konnte nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Tat ARM Region nicht nur wie unter 5.1 gezeigt von p300, sondern auch von pCAF an einem einzelnen Lysin acetyliert wird. Interessanterweise wurde die Acetylierung der Tat ARM durch pCAF nicht beobachtet, wenn statt des 14 Aminosäure langen Peptids $^{45}\text{ISYGRKKRRQRRRP}^{58}$ das unter 5.1 benutzte neun Aminosäuren lange Peptid $^{45}\text{ISYGRKKRR}^{53}$ verwendet wurde (ohne Abb.).

5.3.2 pCAF acetyliert Lysin 50 im ARM von Tat

Um zu analysieren, welcher der beiden im Tat ARM enthaltenen Lysinreste 50 und 51 von pCAF acetyliert wird, wurde das in Gegenwart von AcCoA und pCAF inkubierte ARM Peptid $^{45}\text{ISYGRKKRRQRRRP}^{58}$ einer Endoproteinase Lys-C Verdau unterzogen und die entstehenden Fragmente durch anschließende MALDI TOF MS Analyse charakterisiert. Dabei konnten aufgrund der nichtquantitativen Reaktion sowohl in der Negativkontrolle als auch in dem in Gegenwart von pCAF durchgeführten Acetylierungsansatz die Spaltprodukte des unmodifizierten ARM Peptids bei m/z 723, 851 und 1024 detektiert werden (Abb. 5.14A). Nach Inkubation mit pCAF ist im Spektrum zusätzlich ein signifikantes Signal bei m/z 893 zu sehen, welches gegenüber dem Signal bei m/z 851 um charakteristische + 42 Da verschoben ist (Abb. 5.14A, oberes Spektrum). Dieses Signal entspricht dem Peptid $^{45}\text{ISYGRKK}^{51}$, welches durch Spaltung der Peptidbindung auf der carboxyterminalen Seite von Lysin 51 entstanden ist. Aufgrund der Spezifität von Lys-C für unmodifizierte Lysine muss in der acetylierten Form dieses Peptids das Lysin 51 in unmodifizierter Form und das Lysin 50 in acetylierter Form vorliegen. Dagegen konnte das für die Lysin 51 Acetylierung charakteristische Signal bei m/z 1194 nicht detektiert werden, so dass wie zuvor für p300 auch für pCAF eine signifikante Acetylierung von Lysin 51 unter den angewandten Bedingungen auszuschließen ist. Insgesamt entsprechen sich die drei Spektren der in Gegenwart von p300 und pCAF acetylierten Tat ARM Peptide und des synthetisch an Lysin 50 acetylierten Tat ARM Peptids nach jeweiligem Lys-C Verdau (vergleiche die Spektren in Abb. 5.2 und 5.14A). Zusätzlich zu p300 acetyliert somit auch pCAF spezifisch das Lysin 50 in der Tat ARM.

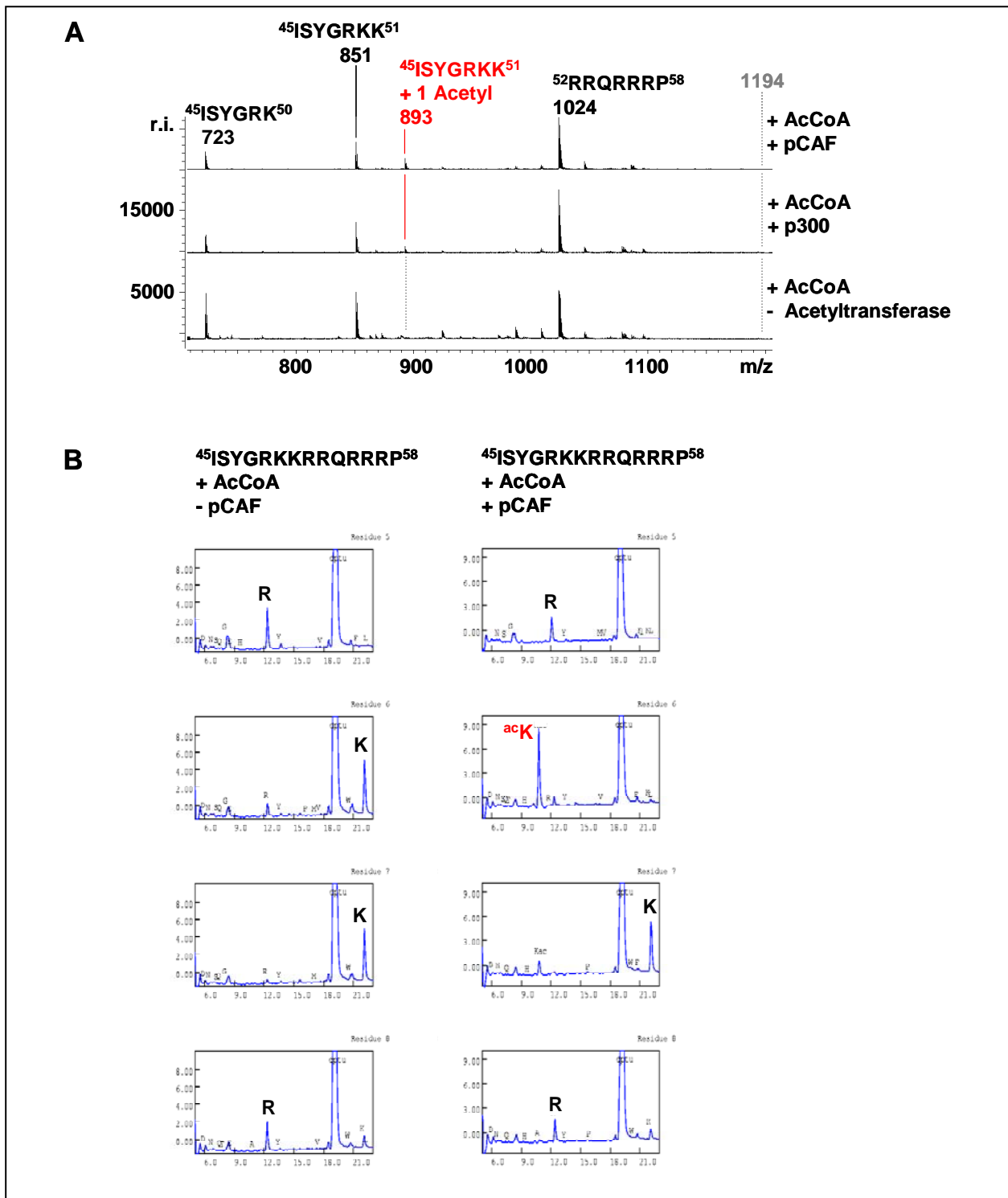


Abb. 5.14: pCAF acetyliert Lysin 50 im ARM von Tat. A: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat ARM Peptids ISYGRKKRRQRRRP (Aminosäure 45-58) nach Lys-C Verdau. Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF wurde ein Signal bei m/z 893 detektiert, welches auf die enzymatische Acetylierung von Lysin 50 hinwies (rote Markierung). Kein Signal wurde gefunden für das an Lysin 51 acetylierte Spaltprodukt bei m/z 1194 (gepunktete Markierung). Das Signalmuster des Lys-C verdauten Peptids war unabhängig davon, ob die Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF oder p300 erfolgte (vergleiche oberes und mittleres Spektrum). Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von Acetyltransferasen wurden keine acetylierten Spaltprodukte detektiert (gepunktete Markierung). B: Abbauschritte 5 bis 8 der Edman Sequenzierung des *in vitro* mit pCAF acetylierten Tat ARM Peptids ISYGRKKRRQRRRP (Aminosäure 45-58). Linke Spalte: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von pCAF waren die Retentionszeiten der PTH Derivate von Lysin 50 und 51 (Abbauschritt 6 und 7) identisch mit der des Lysinrestes im PTH Standard. Rechte Spalte: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF eluierte das PTH Derivat von Lysin 50 (Abbauschritt 6) bereits nach 10 min, was auf eine enzymatische Acetylierung dieses Restes hinwies (rote Markierung).

Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde das in Gegenwart von pCAF acetylierte Tat ARM Peptid $^{45}\text{ISYGRKKRRQRRRP}^{58}$ der Edman Sequenzierung unterzogen. Wie erwartet wurde im Abbauschritt für Lysin 50 der für Acetyl-Lysin spezifische Peak bei einer Retentionszeit von circa 10 min detektiert (Abb. 5.14B, rechte Spalte, Residue 6). Dieser Peak konnte weder für Lysin 51 nach Inkubation des Peptids mit AcCoA und pCAF gefunden werden, noch für Lysin 50 nach Inkubation mit AcCoA allein in Abwesenheit von pCAF. Diese Lysinreste zeigten eine Retentionszeit von circa 22 min, die dem PTH Derivat von unmodifiziertem Lysin entsprach (Abb. 5.14B, linke Spalte, Residue 6 und 7, und rechte Spalte, Residue 7). Die spezifische Acetylierung von Lysin 50 durch pCAF wurde somit durch den Edman Abbau bestätigt.

Zur Charakterisierung der Acetylierungsstellen von pCAF in Tat erfolgte schließlich der Lys-C Verdau des synthetischen vollständigen 1 Exon Tat Proteins (Aminosäure 1-72) nach *in vitro* Acetylierung in Anwesenheit von AcCoA und pCAF oder mit AcCoA allein als Negativkontrolle. Im MALDI TOF MS Spektrum konnte nach Inkubation des Peptids in Gegenwart von pCAF wiederum nur ein einziges um + 42 Da verschobenes Signal detektiert werden. Erwartungsgemäß handelte es sich dabei um das Signal des acetylierten Tat ARM Peptids $^{42}\text{ALGISYGR}^{\text{ac}}\text{KK}^{51}$ bei m/z 1135, welches wie in den Spektren zuvor aufgrund der nichtquantitativen Reaktion von den Signalen der unmodifizierten Tat ARM Peptide $^{42}\text{ALGISYGRK}^{50}$ (m/z 965) und $^{42}\text{ALGISYGRKK}^{51}$ (m/z 1093) begleitet wurde (Abb. 5.15 A und B, jeweils oberes Spektrum). Im MALDI TOF MS Spektrum des in pCAF Abwesenheit durchgeführten negativen Kontrolllexperiments dagegen fehlte das Signal bei m/z 1135 (Abb. 5.15A und B, jeweils unteres Spektrum). Hinweise für eine zusätzliche enzymatische Acetylierung von Lysin 51 oder anderen in Tat enthaltenen Lysinen konnten nicht gefunden werden. Somit konnte auch bei der MALDI TOF MS Analyse des vollständigen Tat Proteins festgestellt werden, dass sich das Peptidmuster des Lys-C Verdaus nicht änderte, wenn die *in vitro* Acetylierung in Gegenwart von pCAF statt p300 durchgeführt wurde.

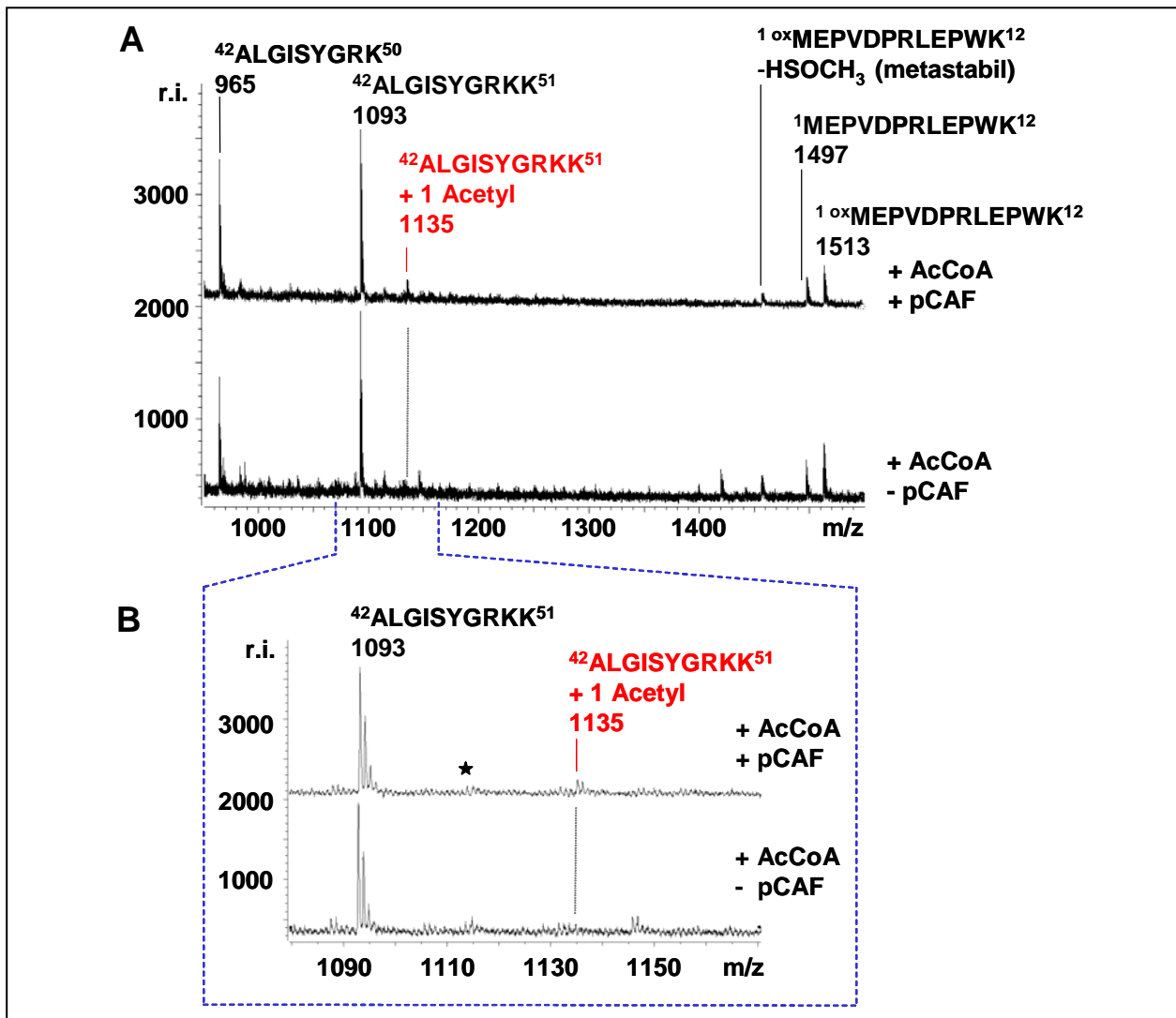


Abb. 5.15: Lysin 50 ist die einzige spezifische Acetylierungsstelle von pCAF in Tat. MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat Proteins (Aminosäuren 1-72) nach Lys-C Verdau. A: Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF wurde ein einziges zusätzliches Signal bei m/z 1135 detektiert, welches auf die enzymatische Acetylierung von Lysin 50 im Peptid ALGISYGRacKK (Aminosäuren 42-51) hinwies (rote Markierung). Unteres Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von pCAF wurden keine acetylierten Spaltprodukte detektiert (gepunktete Markierung). B: Vergrößerung des m/z-Bereichs 1080-1170 der MALDI TOF MS Spektren in A. ★Natriumaddukte

Zusammenfassend wurde folglich auf Peptid- und auf Proteinebene Lysin 50, das spezifische Acetylierungsziel von p300, auch als einziges spezifisches Acetylierungsziel von pCAF in Tat identifiziert.

5.4 Die nichtenzymatische Acetylierung von Cysteinen in HIV-1 Tat

Bei der unter 5.3 beschriebenen *in vitro* Analyse der enzymatischen Acetylierung von Tat durch pCAF zeigten zusätzlich zum Tat ARM Peptid die Peptide $^{22}\text{CTNCYCKKCCFHCQ}^{35}$ und $^{35}\text{VCFITKALGISYG}^{48}$ die für eine Acetylierung charakteristischen Massenverschiebungen von + 42 Da im MALDI TOF MS Spektrum (Abb. 5.13B und C, jeweils oberes Spektrum). Diese Peptide entsprechen der Tat Cystein-reichen Region (CRR), die ein Doppellysinmotiv an den Positionen 28 und 29 einschließt, und der Tat Kernregion, die das einzelne Lysin 41 enthält. Interessanterweise wurden für beide Peptide die Acetylierungssignale auch in den Spektren der negativen Kontrollansätze gefunden, deren Inkubation in Anwesenheit von AcCoA, aber Abwesenheit von pCAF erfolgte (Abb. 5.13B und C, jeweils unteres Spektrum). Ebenso unerwartet war die wiederum von der Anwesenheit von pCAF unabhängige Bindung von bis zu vier Acetylgruppen an das Tat CRR Peptid, das außer Lysin 28 und Lysin 29 keine weiteren Lysine enthält. Entgegen der nichtquantitativen Acetylierungsreaktion der Peptide, die der Tat Kernregion und dem Tat ARM entsprechen, war das nichtacetylierte Tat CRR Peptid (m/z 1684) nur mit sehr geringer Intensität detektierbar (vergleiche Abb. 5.13B, C und D).

Diese Beobachtungen weisen auf einen starken pCAF unabhängigen Transfer von Acetylgruppen von AcCoA auf die Tat CRR und in geringerem Ausmaß auf die Tat Kernregion. Um die Grundlagen der Reaktion zu erfassen, erfolgte wie nachstehend beschrieben eine detaillierte Analyse der *in vitro* Acetylierung der Tat CRR.

5.4.1 Die Tat CRR wird mehrfach nichtenzymatisch acetyliert

Wie eingangs erläutert, wurde das Tat CRR Peptid $^{22}\text{CTNCYCKKCCFHCQ}^{35}$ durch die Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit von pCAF mindestens dreifach acetyliert, obwohl die Region nur zwei Lysinreste an Position 28 und 29 enthält. Diese nichtenzymatische Acetylierung der Tat CRR bestätigte sich des weiteren in den MALDI TOF MS Spektren der Negativkontrollen, die im Rahmen der unter 5.1 erwähnten Analyse der enzymatischen Acetylierung von Tat durch p300 angefertigt wurden. Unabhängig von der Gegenwart von p300 oder pCAF während der *in vitro* Acetylierung zeigten die MALDI TOF MS Spektren des Tat CRR Peptids dieselben Peptidmuster (Abb. 5.16). In jedem der drei Acetylierungsansätze konnten drei signifikante Acetylierungssignale mit m/z -Werten von 1725, 1767 und 1809 in Begleitung der zugehörigen Natriumaddukte gefunden werden. Eine spezifische Acetylierung des Peptids durch p300 oder pCAF sollte sich trotz möglicher gegenseitiger Suppression der Signale in der Detektion einer zusätzlichen Acetylierung oder der Änderung der relativen

Intensitäten der Signale zueinander widerspiegeln. Da weder eine signifikante vierte Acetylierung noch ein Unterschied der Signalintensitäten beobachtet wurde, ist eine spezifische Acetylierung von Lysin 28 oder 29 durch p300 oder pCAF unwahrscheinlich.

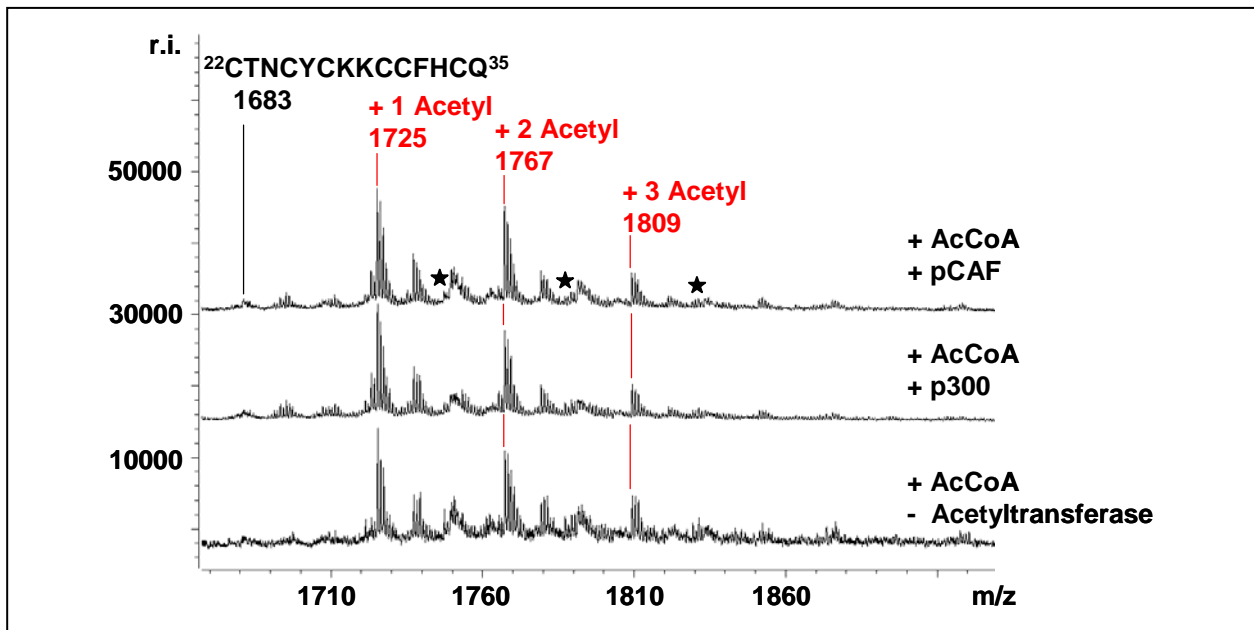


Abb. 5.16: Die Tat CRR wird mehrfach nichtenzymatisch acetyliert. MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat CRR Peptids CTNICYCKKCCFHCQ (Aminosäuren 22-35). Oberes Spektrum: Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF wurden neben dem schwachen Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1683 drei signifikante um jeweils + 42 Da verschobene zusätzliche Signale bei m/z 1725, 1767 und 1809 detektiert (rote Markierung). Dieses Signalmuster war unabhängig davon, ob die Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF oder p300 oder in Abwesenheit von Acetyltransferasen erfolgte (vergleiche oberes, mittleres und unteres Spektrum), was auf einen enzymunabhängigen Transfer von drei Acetylgruppen auf das Peptid hinwies. ★Natriumaddukte

Das gleiche komplexe Peptidmuster zeigte sich bei der Analyse eines Peptids der willkürlichen Sequenz NTCFKCCCHKCYQC, dessen absolute Aminosäurezusammensetzung dem originalen Tat CRR Peptid entspricht. Nach Inkubation dieses Peptids mit AcCoA in Anwesenheit und Abwesenheit von pCAF wurden wiederum drei Acetylierungen mit m/z-Werten von 1725, 1767 und 1809 im MALDI TOF MS detektiert (Abb. 5.17A). Das weist darauf hin, dass die beobachtete nichtenzymatische Acetylierung nicht von der Sequenz des Tat CRR Peptids abhängt, sondern nur auf seine Aminosäurezusammensetzung zurückzuführen ist.

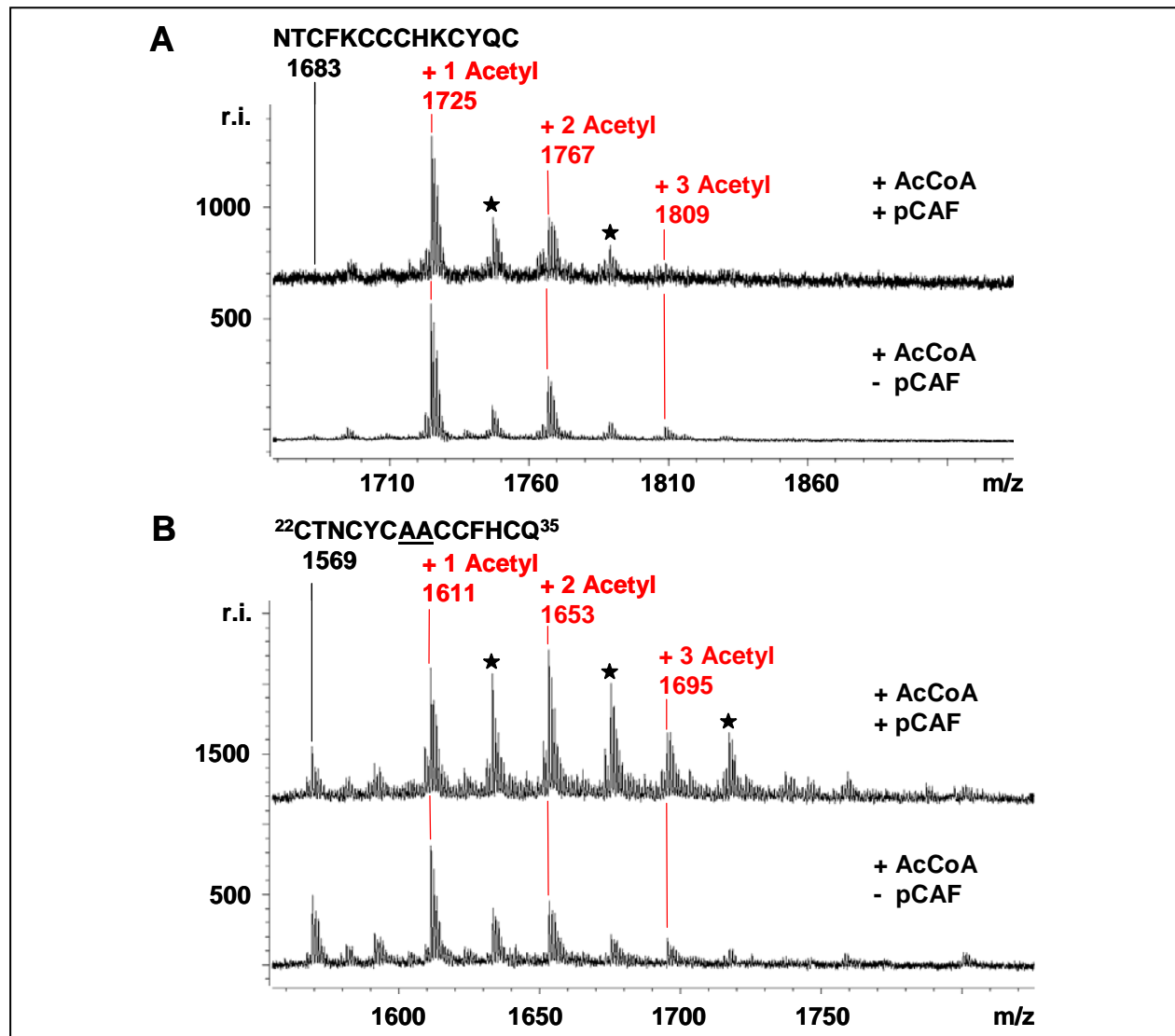


Abb. 5.17: Die mehrfache nichtenzymatische Acetylierung der Tat CRR ist unabhängig von der Sequenz der Tat CRR und der Anwesenheit von Lysin. A: MALDI TOF MS Analyse eines *in vitro* acetylierten Peptids NTCFKCCCHKCYQC, in dem die in der Tat CRR enthaltenen Aminosäuren zu einer willkürlichen Sequenz zusammengesetzt wurden. Nach Inkubation mit AcCoA wurden neben dem schwachen Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1683 drei um jeweils + 42 Da verschobene zusätzliche Signale bei m/z 1725, 1767 und 1809 detektiert (rote Markierung). Dieses Signalmuster des acetylierten Peptids war unabhängig von der Gegenwart von pCAF während der Inkubation mit AcCoA (vergleiche oberes und unteres Spektrum) und war identisch mit dem des Tat CRR Wildtypepeptids (vergleiche Abb. 5.16). B: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat CRR Mutantenpeptids CTNICYCKCCCFHCQ (Aminosäuren 22-35), in dem Lysin 28 und 29 durch Alanine ersetzt wurden. Das detektierte Signalmuster zeigte wiederum unabhängig von der Gegenwart von pCAF während der Inkubation mit AcCoA neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1569 drei um jeweils + 42 Da verschobene Signale bei m/z 1611, 1653 und 1695 (rote Markierung) und entsprach damit dem des Tat CRR Wildtypepeptids (vergleiche Abb. 5.16). ★Natriumaddukte

5.4.2 Die mehrfache nichtenzymatische Acetylierung der Tat CRR ist unabhängig von der Anwesenheit von Lysin

Sowohl das originale Tat CRR Peptid als auch das Peptid mit der Zufallssequenz enthalten zwei Lysinreste. Trotzdem wurden aber für beide Peptide mindestens drei Acetylierungen gefunden. Um auszuschließen, dass zusätzlich zu den ϵ -Aminogruppen der internen Lysine die freie

Aminogruppe am N-Terminus des Peptids nichtenzymatisch acetyliert wurde, erfolgte die Wiederholung der Analyse unter Verwendung des aminoterminal biotinylierten CRR Peptids Biotin-²²CTNCYCKKCCFHCQ³⁵. Wiederum unabhängig von der Anwesenheit einer Acetyltransferase im *in vitro* Acetylierungsansatz zeigte sich in der MALDI TOF MS Analyse des biotinylierten Peptids das bereits bekannte und für eine dreifache Acetylierung charakteristische Peptidmuster (ohne Abb.). Da die aminoterminal Aminogruppe durch die Biotinylierung für eine Reaktion mit einer Acetylgruppe blockiert war, konnte der N-Terminus als zusätzliche dritte Acetylierung ausgeschlossen werden. Die damit verbundene Frage, ob zumindest eine zweifache Acetylierung der verschiedenen CRR Peptide auf der Acetylierung der Aminogruppen der enthaltenen Lysine beruhte, wurde anhand eines Tat CRR Peptids untersucht, in dem die beiden Lysinreste an Position 28 und 29 durch Alaninreste ersetzt wurden (²²CTNCYCAACCFHCQ³⁵). Nach *in vitro* Acetylierung dieses Peptids zeigte sich im MALDI TOF MS Spektrum mit drei Acetylierungen der m/z-Werte 1611, 1653 und 1695 erneut das bekannte Peptidmuster in Unabhängigkeit von der Anwesenheit von Acetyltransferase (Abb. 5.17B). Dieses Ergebnis verstärkte die Annahme, dass andere Aminosäurereste als Lysine für die nichtenzymatische Bindung von Acetylgruppen an die Tat CRR Peptide verantwortlich sein mussten.

5.4.3 Die mehrfache nichtenzymatische Acetylierung der Tat CRR ist abhängig von der Anwesenheit von ungeschützten Cysteinen

Wegen der hohen Anzahl an Cysteinresten in allen bisher im Rahmen der Tat CRR Acetylierung untersuchten Peptide lag die Vermutung nah, dass die Seitenkette von Cystein als Akzeptor für Acetylgruppen dienen konnte. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden alle enthaltenen Cysteine durch Schutz der freien Sulfhydrylgruppe mittels einer Acetamidomethyl- (acm-)gruppe von einer möglichen Acetylierung ausgeschlossen (²²acmCTN^{acm}CY^{aacm}CKK^{acm}C^{acm}CFH^{acm}CQ³⁵). Die auf die in Abwesenheit von Acetyltransferasen durchgeführte *in vitro* Acetylierung des Peptids folgende MALDI TOF MS Analyse zeigte deutlich, dass der nichtenzymatische Transfer von Acetylgruppen von AcCoA auf das Peptid durch die Einführung der acm-Schutzgruppen vollständig verhindert wurde (Abb. 5.18, unteres Spektrum). Nur ein einziges Signal mit einem dem nichtacetylierten Peptid entsprechenden m/z-Wert von 2109 in Begleitung seines Natriumaddukt-Signals bei m/z 2131 konnte detektiert werden.

Somit beruhte die beobachtete nichtenzymatische Acetylierung des Tat CRR Peptids auf der Fähigkeit der Cysteinseitenketten, als Acetylgruppenakzeptoren zu fungieren. Da die zugrunde liegende Reaktion auf einer S-Acetylierung der Sulfhydrylgruppe beruht, ist die nichtenzymatische Acetylierung von Cysteinen abhängig von der freien Cysteinseitenkette.

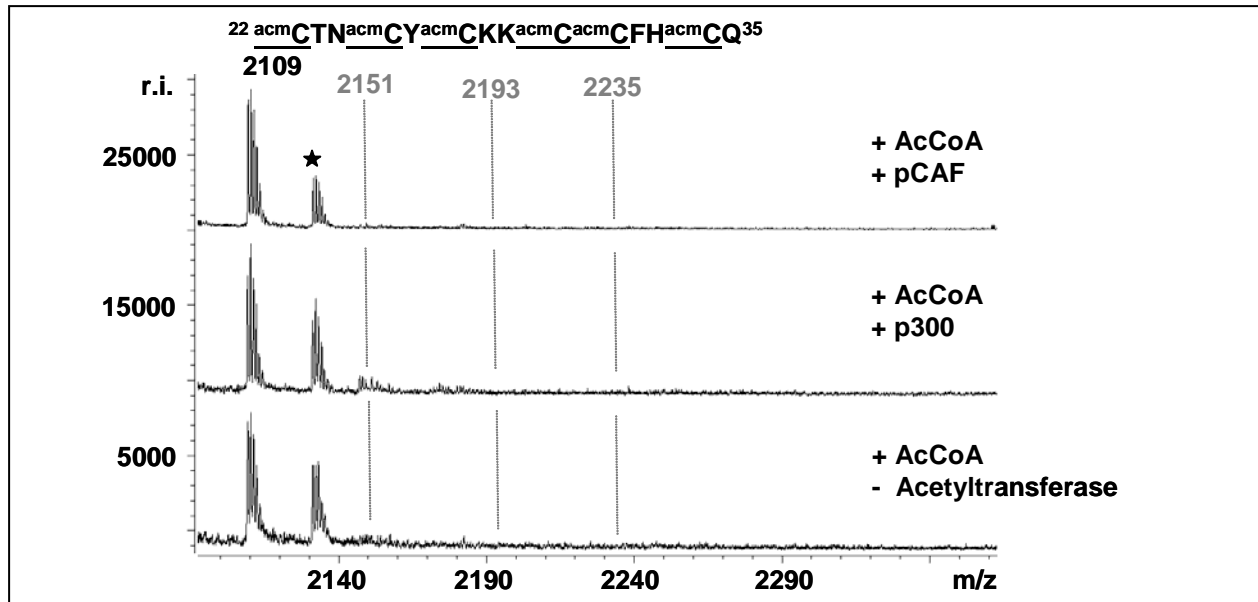


Abb. 5.18: Die mehrfache Acetylierung der Tat CRR beruht auf der nichtenzymatischen Acetylierung von Cysteinen. MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat CRR Mutantenpeptids acmCTNacmCYacmCKKacmCacmCFHacmCQ (Aminosäuren 22-35), in dem alle enthaltenen Cysteine durch eine acm-Gruppe geschützt wurden. Unabhängig davon, ob die Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF, p300 oder in Abwesenheit einer Acetyltransferase erfolgte, wurde ausschließlich das Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 2109 detektiert (vergleiche oberes, mittleres und unteres Spektrum). Die Signale der ein-, zwei- oder dreifach acetylierten Peptide wurden nicht detektiert (gepunktete Markierung). ★ Natriumaddukte

Eine enzymatische Acetylierung des acm-geschützten Tat CRR Peptids durch Inkubation mit AcCoA und p300 oder pCAF konnte mittels MALDI TOF MS der Acetylierungsreaktionen nicht detektiert werden (Abb. 5.18, oberes und mittleres Spektrum). In Übereinstimmung mit der Negativkontrolle zeigte das Spektrum nur das Signal des nichtacetylierten Peptids mit m/z 2109 sowie das Signal seines Natriumadduktes. Wie bereits bei der Analyse des originalen Tat CRR Peptids vermutet, ist somit eine spezifische enzymatische Acetylierung der Lysine 28 oder 29 durch p300 oder pCAF auszuschließen.

5.4.4 Die nichtenzymatische Acetylierung von Cysteinen ist unabhängig von der Aminosäuresequenz eines Peptids

Die oben beschriebene Analyse des Peptids NTCFKCCCHKCYQC ließ bereits vermuten, dass die mehrfache nichtenzymatische Cystein-Acetylierung der Tat CRR nicht auf der speziellen Sequenz des Peptids, sondern auf der grundsätzlichen Fähigkeit von Cysteinen, in Peptiden als Acetylgruppenakzeptoren zu fungieren, beruht.

Um die Rolle von Cysteinen in Acetylierungsreaktionen weiter zu überprüfen, wurde eine Reihe von Cysteinmutanten des Tat ARM synthetisiert, da dessen Verhalten in *in vitro* Acetylierungsreaktionen aus den unter 5.1 und 5.3 beschriebenen Studien bekannt war. Ausserdem erschwerte die Zahl der Cysteine der Tat CRR in Kombination mit der limitierten Sensitivität des MALDI TOF Massenspektrometers für eventuell nur in geringer Menge vorliegende mehrfach acetylierte Peptide die Interpretation der Spektren bezüglich der absoluten Zahl der an das Peptid gebundenen Acetylgruppen.

Wie vorangehend gezeigt, wird das Tat ARM Peptid $^{45}\text{ISYGRKKRRQRRP}^{58}$ sowohl von p300 als auch von pCAF spezifisch an Lysin 50 acetyliert. Die MALDI TOF MS Spektren dieses Peptids zeigten nach *in vitro* Acetylierung jeweils das Signal des nichtacetylierten Peptids bei m/z 1857 und das um + 42 Da verschobene Signal des einfach acetylierten Peptids bei m/z 1899 (Abb. 5.19A, oberes und mittleres Spektrum). Das einer zusätzlichen Acetylierung von Lysin 51 entsprechende Signal bei m/z 1941 konnte weder nach Zugabe von p300 noch pCAF zum Acetylierungsansatz pCAF detektiert werden. Kein Acetylierungssignal bei m/z 1899 zeigte das Peptid in der Negativkontrolle, bei der die Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit der Acetyltransferasen erfolgte (Abb. 5.19A, unteres Spektrum). Im entsprechenden MALDI TOF MS Spektrum konnte nur das Signal des nichtacetylierten Peptids bei m/z 1857 in Begleitung des Natriumadduktsignals bei m/z 1879 gefunden werden.

Die Auswirkungen eines Cysteinrestes auf die Acetylierung des Tat ARM wurde anhand eines Mutantenpeptids untersucht, in dem Arginin 49 durch Cystein ersetzt wurde ($^{45}\text{ISYG}\underline{\text{C}}\text{KKRRQRRP}^{58}$). Wie erwartet zeigte dieses Peptid des m/z -Wertes 1804 im MALDI TOF MS Spektrum der Negativkontrolle ein einzelnes Acetylierungssignal bei m/z 1846, welches ausschließlich auf die nichtenzymatische Acetylierung des eingeführten Cysteinrestes zurückzuführen ist (Abb. 5.19B, unteres Spektrum). Die Zugabe von p300 bzw. pCAF zum Acetylierungsansatz führte zur Verschiebung des Signals um weitere + 42 Da auf den m/z -Wert 1888, was auf eine erfolgreiche enzymatischen Acetylierung von Lysin 50 hinweist (Abb. 5.19B, oberes und mittleres Spektrum). Die Einführung des nichtenzymatisch acetylierbaren Cysteinrestes unmittelbar vor Lysin 50 im Tat ARM verhinderte somit nicht die enzymatische Acetylierung des Lysins durch p300 oder pCAF.

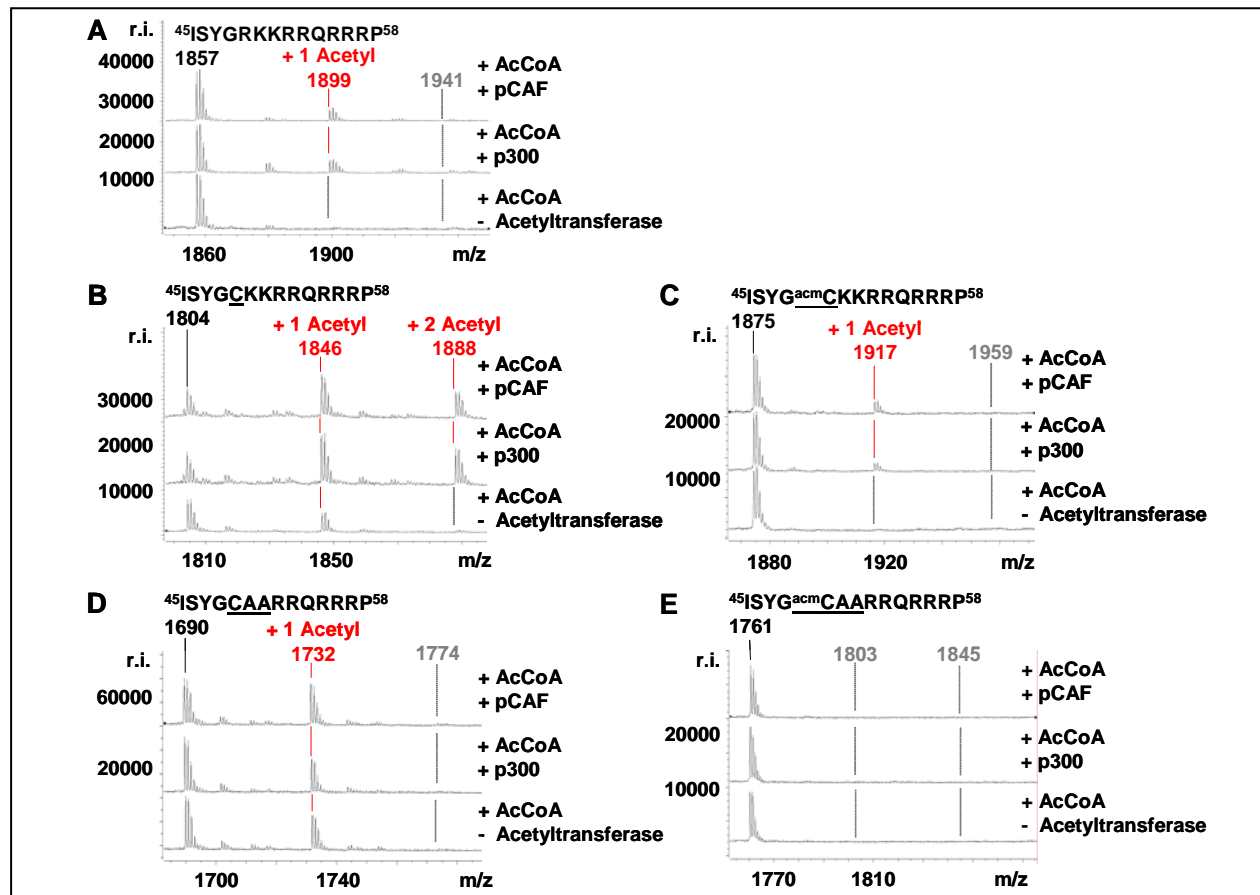


Abb. 5.19: Die nichtenzymatische Acetylierung von Cysteinen ist unabhängig von der umgebenden Peptidsequenz. MALDI TOF MS Analysen verschiedener Cysteinmutanten des Tat ARM nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF oder p300 oder in Abwesenheit einer Acetyltransferase. A. Für das Tat ARM Wildtyppeptid ISYGRKKRRRQRRRP (Aminosäuren 45-58) wurde nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF (oberes Spektrum) oder p300 (mittleres Spektrum) neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1857 das Signal des einfach acetylierten Peptids bei m/z 1899 detektiert (rote Markierung), nicht aber das Signal des zweifach acetylierten Peptids bei m/z 1941 (gepunktete Markierung). Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit einer Acetyltransferase wurden keine Signale von acetylierten Peptiden detektiert (unteres Spektrum). B. Für das Tat ARM Mutantypeptid ISYGCKKRRRQRRRP (Aminosäuren 45-58), in dem Arginin 49 durch Cystein ersetzt wurde, wurden nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF (oberes Spektrum) oder p300 (mittleres Spektrum) neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1804 die Signale des einfach und des zweifach acetylierten Peptids bei m/z 1846 und 1888 detektiert (rote Markierung). Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit einer Acetyltransferase wurden nur die Signale des unmodifizierten und des einfach acetylierten Peptids detektiert (unteres Spektrum), was auf eine enzymatische Acetylierung von Lysin 50 durch pCAF und p300 und eine nichtenzymatische Acetylierung von Cystein 49 in diesem Peptid hinwies. C. Nach Schutz des an Position 49 eingeführten Cysteinrestes durch eine acm-Gruppe im Tat ARM Mutantypeptid ISYG^{acm}CKKRRRQRRRP (Aminosäuren 45-58) wurde nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF (oberes Spektrum) oder p300 (mittleres Spektrum) neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1875 das Signal des einfach acetylierten Peptids bei m/z 1917 detektiert (rote Markierung), nicht aber das Signal des zweifach acetylierten Peptids bei m/z 1959 (gepunktete Markierung). Nach Inkubation mit AcCoA in Abwesenheit einer Acetyltransferase wurden keine Signale von acetylierten Peptiden detektiert (unteres Spektrum), was auf eine ausschließlich enzymatische Acetylierung von Lysin 50 durch pCAF und p300 in diesem Peptid hinwies. D. Für das Tat ARM Mutantypeptid ISYGCAARRQRRRP (Aminosäuren 45-58), in dem Arginin 49 durch Cystein und Lysin 50 und 51 durch Alanin ersetzt wurden, wurde nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF (oberes Spektrum) oder p300 (mittleres Spektrum) und nach Inkubation in Abwesenheit einer Acetyltransferase neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1690 das Signal des einfach acetylierten Peptids bei m/z 1732 detektiert (rote Markierung), nicht aber das Signal des zweifach acetylierten Peptids bei m/z 1774 (gepunktete Markierung), was auf eine ausschließlich nichtenzymatische Acetylierung von Cystein 49 in diesem Peptid hinwies. E. Nach Schutz des an Position 49 eingeführten Cysteinrestes durch eine acm-Gruppe im Tat ARM Mutantypeptid ISYG^{acm}CAARRQRRRP (Aminosäuren 45-58), in dem Lysin 50 und 51 durch Alanin ersetzt wurden, wurden nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von pCAF (oberes Spektrum) oder p300 (mittleres Spektrum) und nach Inkubation in Abwesenheit einer Acetyltransferase keine zusätzlichen Signale neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1761 detektiert (gepunktete Markierung).

Der Schutz der freien Sulfhydrylgruppe des an Position 49 der Tat ARM eingefügten Cysteins durch eine acm-Gruppe ($^{45}\text{ISYG}^{\text{acm}}\underline{\text{CKRRQRRRP}}^{58}$) verhinderte wie erwartet die nichtenzymatische Acetylierung, wie unter 5.4.3 anhand der Tat CRR Peptide gezeigt wurde. Entsprechend konnte im MALDI TOF MS Spektrum des Peptids nach der *in vitro* Acetylierung ausschließlich das nichtacetylierte Peptid mit einem m/z-Wert von 1875 detektiert werden. (Abb. 5.19C, unteres Spektrum). Die enzymatische Acetylierung des nachfolgenden Restes Lysin 50 durch p300 oder pCAF dagegen konnte ungehindert ablaufen, wie im Spektrum durch die Detektion eines um + 42 Da auf m/z 1917 verschobenen zusätzlichen Signals ersichtlich wurde (Abb. 5.19C, oberes und mittleres Spektrum).

Somit unterlag die enzymatische Acetylierung des Lysinrestes durch p300 oder pCAF keiner sterischen Hinderung durch die acm-Gruppe an dem in unmittelbarer Nachbarschaft eingefügten Cystein. Dieses Ergebnis kann direkt auf das unter 5.4.3 analysierte acm-geschützte Tat CRR Peptid $^{22\text{acm}}\underline{\text{CTN}}^{\text{acm}}\underline{\text{CY}}^{\text{acm}}\underline{\text{CKK}}^{\text{acm}}\underline{\text{C}}^{\text{acm}}\underline{\text{CFH}}^{\text{acm}}\underline{\text{CQ}}^{35}$ übertragen werden, da auch hier unmittelbar vor der möglichen enzymatischen Acetylierungsstelle ein acm-geschütztes Cystein eingeführt wurde. Die Beobachtung, dass weder p300 noch pCAF eines der an den Positionen 28 und 29 dieses Peptids enthaltenen Lysine acetyliert, begründet sich folglich nicht in einer sterischen Hinderung durch die acm-Blockierung der Sulfhydrylgruppe von Cystein 27.

Um die nichtenzymatische Cysteinacetylierung weiter zu untermauern, erfolgte die Analyse eines Tat ARM Mutantenpeptids, in dem Arginin 49 durch Cystein und das Doppellysinmotiv an Position 50 und 51 durch ein Doppelalaninmotiv ausgetauscht wurde ($^{45}\text{ISYG}\underline{\text{CAARRQRRRP}}^{58}$). Wie erwartet stimmen die Peptidmuster der MALDI TOF MS Spektren der beiden acetyltransferasehaltigen Acetylierungsansätze mit dem Spektrum der Negativkontrolle überein (Abb. 5.19D). In allen drei Fällen konnte mit dem Signal bei m/z 1732 eine einfache Acetylierung des Ausgangspeptids mit m/z 1690 detektiert werden. Diese einfache Acetylierung des Peptids nach Abwesenheit von Acetyltransferasen im Acetylierungsansatz ist nur durch einen nichtenzymatischen Transfer einer Acetylgruppe von AcCoA auf das eingeführte Cystein zu erklären, da der alleinige Ersatz der Lysine 50 und 51 durch Alanine im Tat ARM Peptid unter Beibehaltung der umgebenden Peptidsequenz in der Negativkontrolle keine Acetylierung zeigte (ohne Abb.). In Übereinstimmung damit führte die zusätzliche Blockierung der freien Sulfhydrylgruppe des an Position 49 eingeführten Cysteins durch eine acm-Schutzgruppe in der Doppelalaninmutante ($^{45}\text{ISYG}^{\text{acm}}\underline{\text{CAARRQRRRP}}^{58}$) zur völligen Verhinderung einer Acetylierung dieses Peptids. Weder im MALDI TOF MS Spektrum der Negativkontrolle noch in den Spektren der Acetylierungsansätze, die in Gegenwart von p300 und pCAF durchgeführt wurden, konnte eine für Acetylgruppen charakteristische

Massenverschiebung von + 42 Da für das Peptidsignal bei m/z 1761 detektiert werden (Abb. 5.19E).

Aus der Analyse der Cysteinmutanten des Tat ARM Peptids lässt sich schließen, dass die Einfügung eines Cysteinrestes in ein beliebiges Peptid grundsätzlich zur nichtenzymatischen Acetylierung dieses Cysteinrestes in einer *in vitro* Acetylierung führt. Allgemein sollte somit jedes beliebige cysteinhaltige Peptid oder Protein unabhängig von seiner Aminosäuresequenz bei Inkubation mit AcCoA einer nichtenzymatischen Acetylierung unterliegen.

5.4.5 Die Tat Kernregion wird nichtenzymatisch an dem enthaltenen Cystein acetyliert

Obiger Überlegung zufolge sollte auch die unter 5.3 beobachtete nichtenzymatische Acetylierung des Tat Kernpeptids $^{35}\text{VCFITKALGISYG}^{48}$ in der Cystein-Acetylierung des an Position 37 enthaltenen Cysteins begründet liegen. Bereits das MALDI TOF MS Spektrum der Negativkontrolle der *in vitro* Acetylierung zeigte neben dem Signal des nichtacetylierten Peptids bei m/z 1499 das dem einfach acetylierten Peptid entsprechende Signal bei m/z 1541 (Abb. 5.20A, unteres Spektrum). Wie erwartet änderte sich dieses Peptidmuster auch dann nicht, wenn das in der Tat Kernregion sitzende Lysin 41 durch Alanin ersetzt wurde ($^{35}\text{VCFITAALGISYG}^{48}$). Wiederum konnte sowohl im MALDI TOF Spektrum der Negativkontrolle als auch des Acetylierungsansatzes, der in der Anwesenheit von pCAF durchgeführt wurde, neben dem originalen Peptidsignal bei m/z 1443 das um + 42 Da auf m/z 1485 verschobene Signal detektiert werden (Abb. 5.20B). Dagegen führte der Schutz von Cystein 37 in diesem Peptid durch eine acm-Gruppe ($^{35}\text{V}^{\text{acm}}\text{CFITKALGISYG}^{48}$) zur Verhinderung der nichtenzymatischen Acetylierung. Unabhängig davon, ob die *in vitro* Acetylierung in Anwesenheit oder Abwesenheit von pCAF erfolgte, konnte in den MALDI TOF MS Spektren dieses Peptids nur das Signal des nichtacetylierten Peptids bei m/z 1570 begleitet von einem hohen Natriumaddukt signal gefunden werden (Abb. 5.20C). Damit muss auch eine enzymatische Acetylierung von Lysin 41 durch pCAF ausgeschlossen werden. In der MALDI TOF MS Analyse war weder eine Acetylierung des Peptids $^{35}\text{V}^{\text{acm}}\text{CFITKALGISYG}^{48}$ nach Inkubation mit AcCoA und pCAF zu beobachten (Abb. 5.20C, oberes Spektrum), noch zeigte das Originalpeptid $^{35}\text{VCFITKALGISYG}^{48}$ nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart von ein zweites Acetylierungssignal bei m/z 1583 (Abb. 5.20A, oberes Spektrum).

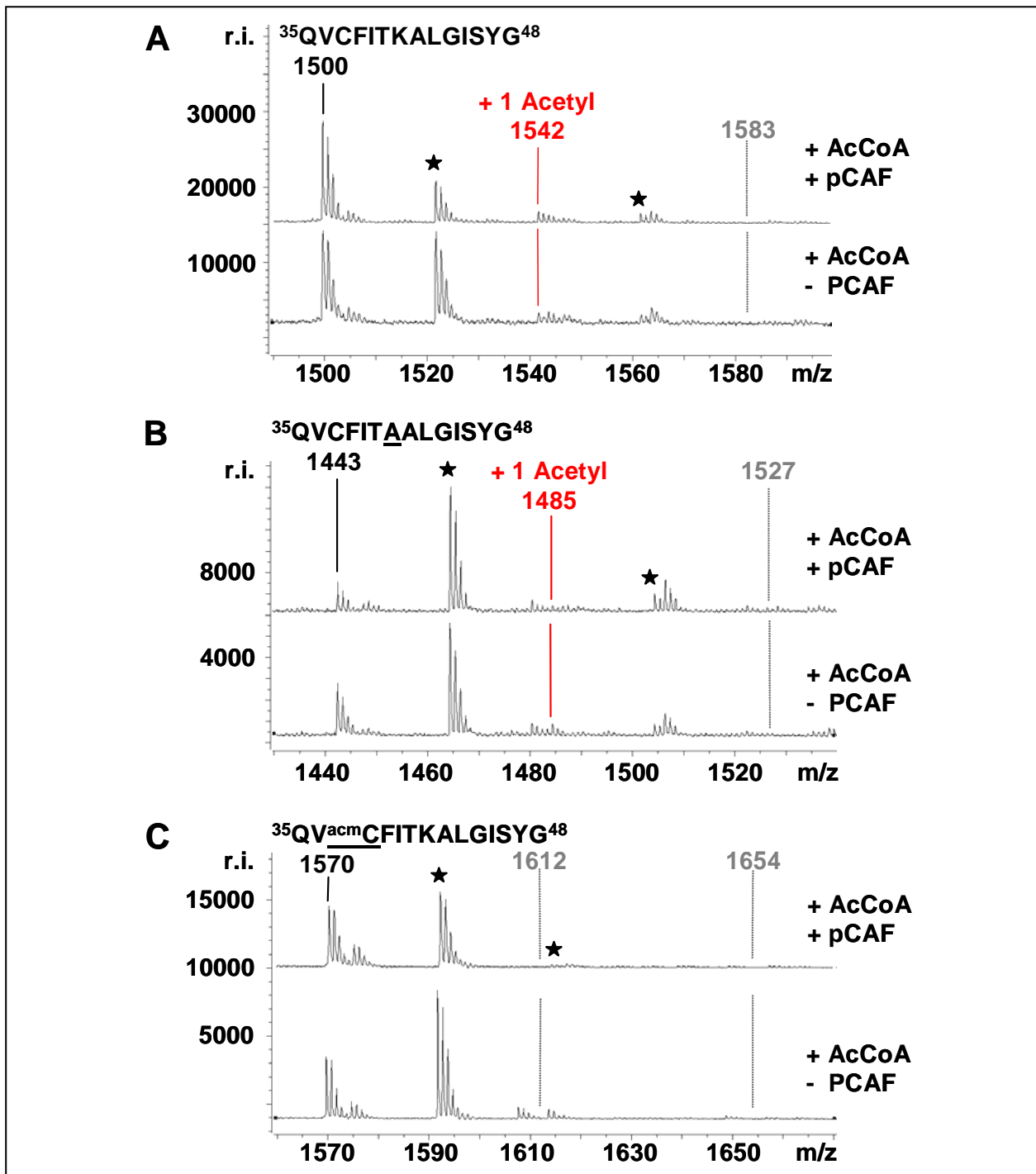


Abb 5.20: Cystein 37 in der Tat Kernregion wird nichtenzymatisch acetyliert. A: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Tat Kernregionpeptids QVCFITKALGISYG (Aminosäure 35-48). Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart (oberes Spektrum) und in Abwesenheit von pCAF (unteres Spektrum) wurde neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1500 das Signal des einfach acetylierten Peptids bei m/z 1542 detektiert (rote Markierung), nicht aber das Signal des zweifach acetylierten Peptids bei m/z 1583 (gepunktete Markierung), was auf eine ausschließlich nichtenzymatische Acetylierung von Cystein 37 hinwies. B: MALDI TOF MS Analyse des *in vitro* acetylierten Mutantenpeptids der Tat Kernregion QVCFITAALGISYG (Aminosäure 35-48), in dem Lysin 41 durch Alanin ersetzt wurde. Nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart (oberes Spektrum) und in Abwesenheit von pCAF (unteres Spektrum) wurde neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1443 das Signal des einfach acetylierten Peptids bei m/z 1485 detektiert (rote Markierung), nicht aber das Signal des zweifach acetylierten Peptids bei m/z 1527 (gepunktete Markierung). Damit entsprach das Signalmuster dieses Mutantenpeptids dem des Wildtyppeptids (vergleiche 5.20A und B). C: Nach Schutz von Cystein 37 durch eine acm-Gruppe im Mutantenpeptid der Tat Kernregion QV^{acm}CFITKALGISYG (Aminosäure 35-48), in dem Lysin 41 durch Alanin ersetzt wurde, wurden nach Inkubation mit AcCoA in Gegenwart (oberes Spektrum) und in Abwesenheit von pCAF (unteres Spektrum) keine zusätzlichen Signale neben dem Signal des unmodifizierten Peptids bei m/z 1570 detektiert (gepunktete Markierung). ★Natriumaddukte

5.4.6 Cystein ist die einzige proteinogene Aminosäure mit enzymunabhängiger Acetylgruppenakzeptorfunktion

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der bisher erfolgten Acetylierungsstudien an Peptiden dadurch verfälscht wurden, dass eine weitere Aminosäure als Acetylgruppenakzeptor dienen kann, wurde das Acetylierungsmuster eines Peptids, das alle 20 natürlichen Aminosäuren enthält, untersucht (LHKSMGRTWQFDYNPEACVIK). Die MALDI TOF MS Analyse dieses Peptids zeigte nach Inkubation mit AcCoA neben dem Peptidsignal bei m/z 2523 ein zusätzliches um + 42 Da auf m/z 2565 verschobenes Signal (Abb. 5.21, oberes Spektrum). Dagegen konnte eine weitere Signalverschiebung auf m/z 2607, charakteristisch für eine zweite Acetylierung, nicht beobachtet werden. Die einfache Acetylierung des Peptids beruhte wiederum auf der nichtenzymatischen Acetylierung des an Position 18 enthaltenen Cysteinrestes. Zum Beweis erfolgte die Analyse eines Kontrollpeptids, dem das Cystein an Position 18 fehlte (LHKSMGRTWQFDYNPEAVIK). Das MALDI TOF MS Spektrum dieses Peptids nach Inkubation mit AcCoA wies ausschließlich das Signal des nichtacetylierten Peptids bei m/z 2420 in Begleitung des Natriumadduktsignals auf, nicht jedoch das Signal für eine einfache Acetylierung (Abb. 5.21, unteres Spektrum).

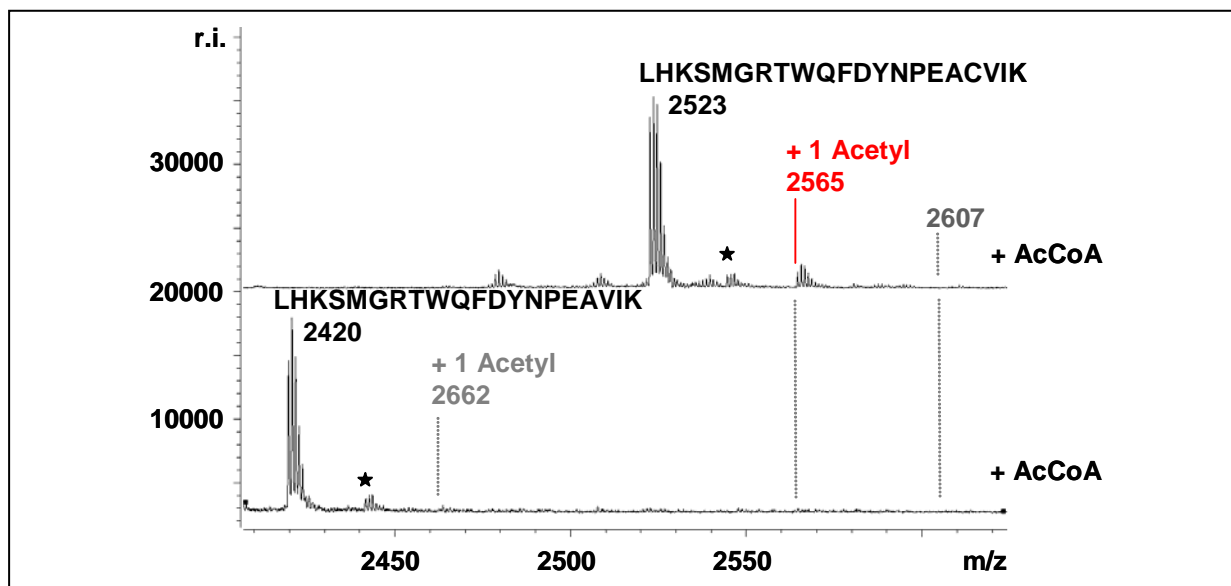


Abb. 5.21: Cystein ist die einzige proteinogene Aminosäure mit enzymunabhängiger Acetylgruppenakzeptorfunktion. MALDI TOF MS Analysen der Peptide LHKSMGRTWQFDYNPEACVIK und LHKSMGRTWQFDYNPEAVIK nach Inkubation mit AcCoA. Neben den Signalen der unmodifizierten Peptide bei m/z 2523 bzw. 2420 wurde nur für das cysteinhaltige Peptid ein um + 42 Da verschobenes Signal detektiert (rote Markierung), was auf die nichtenzymatische Acetylierung ausschließlich des Cysteinrestes in Position 18 hinwies.

Damit kann ausgeschlossen werden, dass in den bisher analysierten Peptiden weitere Aminosäurereste enthalten waren, die während der *in vitro* Acetylierung unbemerkt als Akzeptoren in enzymunabhängigen Transferreaktionen von Acetylgruppen dienten.

5.4.7 Acetyl-Cysteine der Tat CRR können als Acetylgruppendonoren dienen

Um zu überprüfen, ob die an einen Cysteinrest gebundene Acetylgruppe im Rahmen einer Transferreaktion auf ein anderes Peptid übertragen werden kann, wurde das durch AcCoA mehrfach acetylierte biotinylierte Tat CRR Peptid Biotin-²²CTNCYCKKCCFHCQ³⁵ mit Hilfe von ZipTip C18 Pipettenspitzen von überschüssigem AcCoA im Puffer abgetrennt und in einem zweiten Acetylierungsansatz mit synthetischen Histon H3 und H4 Peptiden in Anwesenheit von pCAF inkubiert. Als Negativkontrolle diente hierbei reiner Acetylierungspuffer, der parallel zum Tat CRR Peptid vom enthaltenen AcCoA befreit und mit den Histonpeptiden und pCAF inkubiert wurde. Die verwendeten Histonpeptide entstammen den N-Termini von H3 und H4, die bekannt für ihre Lysinacetylierung durch Acetyltransferasen sind. So acetyliert pCAF *in vitro* wie unter 2.2.3 erläutert Lysin 14 in Histon H3 und Lysin 8 in Histon H4.

Nach Inkubation mit AcCoA zeigte das biotinylierte CRR Peptid in der MALDI TOF MS Analyse neben dem Peptidsignal bei m/z 1909 das erwartete Peptidmuster mit drei signifikanten Acetylierungssignalen bei m/z 1951, 1993 und 2035 (ohne Abb.). Dagegen konnte nach der zweiten Inkubation des acetylierten Biotin-CRR Peptids mit Histonpeptiden und pCAF neben dem Peptidsignal bei m/z 1909 nur noch das für eine einfache Acetylierung charakteristische Signal bei 1951 detektiert werden (Abb. 5.22A und B, jeweils oberes Spektrum). Bei Verwendung des nicht biotinylierten Tat CRR Peptids wurden nach der zweiten Inkubation weder Signale für das nichtacetylierte, noch für das acetylierte CRR Peptid gefunden (ohne Abb.), was durch einen starken Suppressionseffekt durch die Histonpeptide zu erklären ist. Die MALDI TOF MS Spektren der H3 und H4 Histonpeptide zeigten nach der Inkubation mit dem mehrfach acetylierten biotinylierten CRR Peptid in Gegenwart von pCAF neben den Signalen der nichtacetylierten Peptide bei m/z 2197 und 1777 auch die um + 42 Da verschobenen Signale bei m/z 2239 und 1819 (Abb. 5.22 A und B, jeweils oberes Spektrum). Diese zusätzlichen Signale konnten weder in der Negativkontrolle, in der das CRR Peptid von der Inkubation ausgeschlossen wurde (Abb. 5.22 a und B, jeweils unteres Spektrum), noch in einer weiteren Kontrollreaktion, bei der die Inkubation der Histonpeptide mit dem acetylierten CRR Peptid in Abwesenheit von pCAF erfolgte (ohne Abb.), detektiert werden. Somit wurde das während der ersten Inkubation des CRR Peptids als Acetylgruppendonor dienende AcCoA erfolgreich vom Peptid abgetrennt und stand während der zweiten Inkubation nicht mehr zur Verfügung. Der erfolgreiche Transfer von Acetylgruppen auf die Histonpeptide durch pCAF muss deshalb unter Verwendung des acetylierten CRR Peptids als Donor stattgefunden haben.

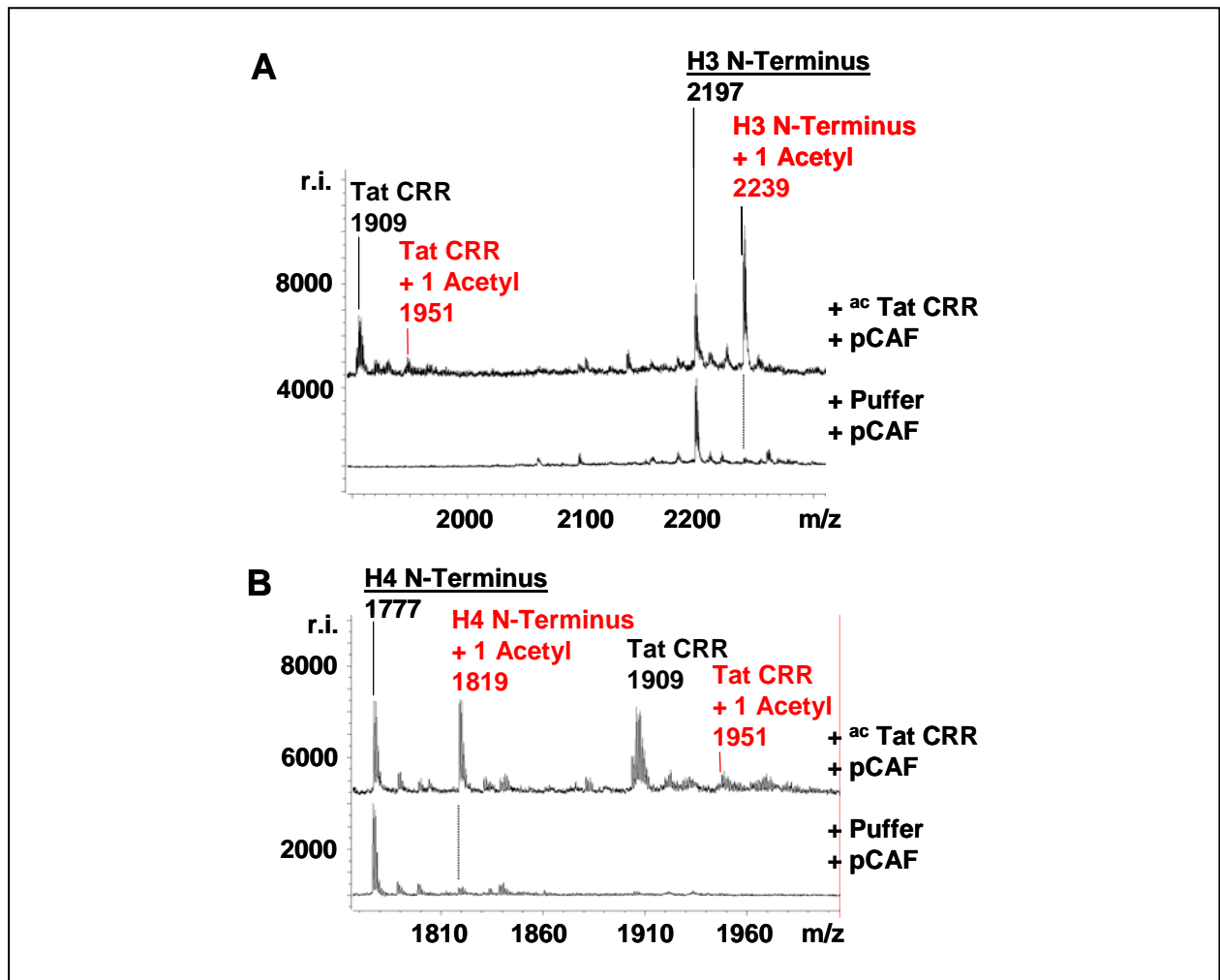


Abb. 5.22: Acetyl-Cysteine der Tat CRR können als Acetylgruppendonoren dienen. Das biotinylierten Tat CRR Peptid Biotin-CTNCYCKKCCFHCQ (Aminosäure 22-35) wurde nach seiner nichtenzymatischen Acetylierung von überschüssigem AcCoA im Puffer abgetrennt und in einem zweiten Acetylierungsansatz mit aminoterminalen Histonpeptiden in Anwesenheit von pCAF inkubiert. Als Negativkontrolle diente reiner Acetylierungspuffer, der vom enthaltenen AcCoA befreit und mit Histonpeptiden und pCAF inkubiert wurde. A: MALDI TOF MS Analyse des Histon H3 Peptids nach Inkubation mit der acetylierten Tat CRR in Anwesenheit von pCAF (oberes Spektrum). Neben den Signalen des unmodifizierten und des einfach acetylierten Tat CRR Peptids bei m/z 1909 und 1951 sowie des unmodifizierten H3 Peptids bei m/z 2197 wurde das Signal des einfach acetylierten H3 Peptids bei m/z 2239 detektiert (rote Markierung). Nach Inkubation in Acetylierungspuffer in Anwesenheit von pCAF wurde ausschließlich das unmodifizierte H3 Peptid detektiert (unteres Spektrum), was auf einen Transfer der Acetylgruppe von den acetylierten Cysteinen des Tat CRR Peptids auf das Histon H3 Peptid durch pCAF hinwies. B: MALDI TOF MS Analyse des Histon H4 Peptids nach Inkubation mit der acetylierten Tat CRR in Anwesenheit von pCAF (oberes Spektrum). Neben den Signalen des unmodifizierten und des einfach acetylierten Tat CRR Peptids bei m/z 1909 und 1951 sowie des unmodifizierten H4 Peptids bei m/z 1777 wurde das Signal des einfach acetylierten H4 Peptids bei m/z 1819 detektiert (rote Markierung). Nach Inkubation in Acetylierungspuffer in Anwesenheit von pCAF wurde wiederum ausschließlich das unmodifizierte H4 Peptid detektiert (unteres Spektrum).

6 Diskussion

6.1 Die Charakterisierung von Acetylierungsstellen mit Hilfe der Massenspektrometrie und der Edman Sequenzierung

Die Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen von Proteinen beruht noch immer vorwiegend auf dem Einbau und der Detektion von radioaktiv markierten Gruppen oder der Verwendung von modifikationsspezifischen Antikörpern in immunochemischen Analysen. Biochemische Methoden wie die Massenspektrometrie wurden bisher hauptsächlich für die Analyse von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungen und zu einem geringeren Anteil auch von Aminosäure-Glykosylierungen verwendet [Kuster and Mann, 1998; Sickmann et al., 2001]. Die vorliegende Arbeit demonstriert und erweitert den Nutzen der Massenspektrometrie für die Charakterisierung von enzymatischen Acetylierungsstellen in Proteinen in drei Punkten.

I Die massenspektrometrische Analyse von *in vitro* durch eine Acetyltransferase acetylierten Peptiden gibt im Gegensatz zu radioaktiven oder immunochemischen Methoden Aufschluss über die Anzahl der kovalent an das Peptid gebundenen Acetylgruppen. Dieser Aspekt ist wie unter 5.4 dargestellt besonders wichtig für die Unterscheidung zwischen der enzymatischen Lysin- und der nichtenzymatischen Cystein-Acetylierung, die allein durch den Vergleich der Anzahl der an das Peptid gebundenen Acetylgruppen mit der Anzahl der enthaltenen Lysin- und Cysteinreste erfolgen kann. Übersteigt die Anzahl der Acetylierungen die der Lysinreste, so ist sicher, dass weitere Aminosäuren acetyliert wurden. Wie unter 5.4.6 gezeigt, stehen als zusätzliche Akzeptoren in derartigen nichtenzymatischen Acetylierungsreaktionen nur Cysteinreste zur Verfügung. Da diese Acetylgruppenakzeptorfunktion von Cysteinresten wie im folgenden unter 6.3 diskutiert bei bisherigen Untersuchungen von Acetylierungsreaktionen entweder gar nicht in Erwägung gezogen oder fälschlich als Autoacetylierung von Proteinen gewertet wurde, findet sich in der Literatur über die Acetylierung von Proteinen durch Acetyltransferasen eine Reihe von Substraten, deren tatsächliche enzymatische Acetylierung als widersprüchlich oder unwahrscheinlich angesehen werden muss.

II Die Massenspektrometrie erlaubt in Kombination mit dem proteolytischen Verdau durch eine der Endoproteinasen Lys-C oder Trypsin die eindeutige Identifizierung der von einer Acetyltransferase acetylierten Lysinreste und macht somit die zeitraubende und kostspielige Herstellung von Mutantenneptiden überflüssig [Ott et al., 1999, Zhang et al., 2002]. Hierbei wird ausgenutzt, dass die für Lys-C und Trypsin spezifische Schnittstelle carboxyterminal von Lysinresten durch eine Acetylierung des Lysins vor der Spaltung geschützt wird. Neben der Einfachheit und Schnelligkeit der Methodik ist dabei von besonderem Vorteil, dass die

eventuelle Generierung von neuen Acetylierungsstellen durch eingeführte Mutationen vermieden werden. Wie unter 5.2.2 bewiesen, ist es möglich, dass eine häufig bei Acetylierungsstudien durchgeführte Glycinmutation eines Peptids ein enzymatisch nicht acetylierbares Lysin in ein Acetylierungsziel für eine Acetyltransferase umwandeln kann, wenn die Glycinmutation in Position Lys-1 oder Lys-2 liegt. Eine derartige Erzeugung von artifiziellen Acetylierungsstellen kann die Begründung sein für die in der Literatur zu findende Vielzahl an Widersprüchen bezüglich der Position enzymatisch acetylierter Lysine in Proteinen, da zu ihrer Untersuchung häufig unterschiedliche Mutationspeptide genutzt wurden (vergleiche Anhang 7.4). Besonders oft herrscht Unklarheit über die enzymatische Acetylierung von Doppellysinmotiven, wie sie an Position 28 und 29 in der Tat CRR und an Position 50 und 51 im Tat ARM enthalten sind. Obwohl sich in der Kombination aus Lys-C Verdau und MALDI TOF Massenspektrometrie wie unter 5.1.2 erläutert eine signifikante Acetylierung durch die Acetyltransferase p300 ausschließlich für Lysin 50 im Tat ARM zeigte, wurde an anderer Stelle von einer zusätzlichen Lysin 51 Acetylierung berichtet [Deng et al., 2000, Col et al. 2002; Bres et al., 2002a]. Tatsächlich scheint der Ersatz eines der beiden Lysine im Tat ARM durch Alanin die Acetylierbarkeit des anderen Lysins zu beeinflussen. So zeigte ein Peptid mit Alaninmutation von Lysin 51 eine einfache Acetylierung durch p300, und als Acetylierungsstelle wurde Lysin 50 identifiziert. Überraschend wurde jedoch auch das Peptid, in dem Lysin 50 durch Alanin ersetzt wurde, einfach acetyliert, was nur durch die Umwandlung von Lysin 51 in ein Acetylierungsziel für p300 erklärbar ist [Ott et al., 1999]. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein durch Mutation in der Tat ARM erzeugtes Dreifachlysinmotiv (⁴⁹ISYGKKKRR⁵³) zweifach von p300 acetyliert wird, und dass neben Lysin 50 der eingeführte Lysinrest selbst als Acetylierungsziel dient. Derartige Studien von Mutationspeptiden beweisen, dass die Massenspektrometrie nicht nur von besonderem Nutzen für die Identifizierung von Acetylierungsstellen von Acetyltransferasen ist, sondern auch zum Verständnis der Sequenzvoraussetzungen von enzymatischen Acetylierungsreaktionen beiträgt.

III Ein zusätzlicher Vorteil der Massenspektrometrie liegt in der möglichen Bestimmung einer peptidspezifischen Konsensussequenz für die enzymatische Acetylierung durch eine Acetyltransferase. Wie unter 5.1.3 dargestellt kann diese Bestimmung direkt in Gemischen aus mehreren Peptiden erfolgen, da die Massenspektrometrie im Gegensatz zu immunchemischen und radioaktiven Methoden zwischen den nur in einer Aminosäure geänderten Peptiden unterschieden kann. Neben der Bedeutung der Ergebnisse für *in vivo* Studien ist das Auffinden einer solchen Konsensussequenz wie unter 5.2.3 gezeigt auch für die Identifizierung neuer Substrate der Acetyltransferase nützlich. Das kann die Charakterisierung von Acetyltransferase-

Reaktionen, welche wie einleitend erwähnt von großer Relevanz in einer Vielzahl von biologischen Prozessen sind, erheblich unterstützen und vereinfachen.

Als weitere biochemische Methode neben der Massenspektrometrie wurde in dieser Arbeit die Peptidsequenzierung nach Edman zur Identifizierung von acetylierten Lysinen genutzt. Diese Technik, die bei der Charakterisierung von posttranslationalen Protein-Modifikationen weitgehend ungenutzt bleibt, kann aufgrund der unterschiedlichen Derivatisierung der unmodifizierten und der acetylierten Seitenkette des Lysins zur eindeutigen Identifizierung der Acetylierungsstelle herangezogen werden. Das durch die Reaktion mit PITC erzeugte Derivat eines Lysins mit unmodifizierter Seitenkette besitzt die höchste Hydrophobizität der PTH-Derivate der 20 proteinogenen Aminosäuren, da es zwei Chromophore trägt: eine PTH-Gruppe durch die Modifikation des N-Terminus des Peptids und eine PTC-Gruppe durch Modifikation der ϵ -Aminogruppe der Seitenkette des Lysins. Als Folge zeigt das Derivat des Lysins eine lange Retentionszeit in einer C18 RP HPLC [Hewick et al., 1981]. Dagegen hat das Derivat eines acetylierten Lysinrestes eine reduzierte Retentionszeit, da die ϵ -Aminogruppe durch die kovalent gebundene Acetylgruppe vor einer PTC-Modifizierung geschützt wird. Damit trägt das Derivat des acetylierten Lysin nur ein Chromophor und eluiert sehr viel früher von einer C18 HPLC-Säule. Da keines der PTH-Derivate der anderen Aminosäuren ein identisches Elutionsprofil besitzt, kann ein acetyliertes Lysin anhand seiner Retentionszeit eindeutig identifiziert werden. Dagegen ist mittels Edmansequenzierung weder die Bestimmung von unmodifizierten noch von acetylierten Cysteinresten möglich. Unmodifizierte Cysteine reagieren mit dem eingesetzten PITC zu N,S-Di-(Phenylthiocarbamoyl)-Cystein, welches in saurer Umgebung zu 1-Phenyl-2-Thiono-4(N-Phenyldithiocarbamoylmethyl)-5-Oxodiazol zyklisiert, das in der C18 RP-HPLC nicht detektierbar ist. Acetylierten Cysteinen ist eine derartige Zyklisierung zwar nicht möglich, jedoch erliegen sie während der Edmanchemie wahrscheinlich einem intramolekularen Transfer der als Thioester an die Cystein-Seitenkette gebundenen Acetylgruppe auf die nach Abspaltung des vorhergehenden Aminosäurerestes freie endständige Aminogruppe. Damit ist der N-Terminus des Peptids für weitere Reaktionen mit PITC blockiert, so dass die Sequenzierung an dieser Stelle abbricht.

Zusammenfassend erlaubt die Verwendung biochemischer Methoden die schnelle und einfache Analyse von Acetylierungsstellen von Peptiden und Proteinen nach *in vitro* Acetylierung. Von besonderem Vorteil ist dabei die Umgehung einer radioaktiven oder immunchemischen Detektion, wohingegen die Kombination von biochemischen, immunchemischen und radioaktiven Methoden weiteren Nutzen besonders in Bezug auf die Quantifizierung und die Kinetik von enzymatischen Acetylierungsreaktionen verspricht. Für die Proteomanalytik ist besonders der proteolytische In-Gel-Verdau von 2D PAGE getrennten Proteinen mit Trypsin

oder Endoproteinase Lys-C vorteilhaft, da die proteolytisch erzeugten Peptide in der MALDI TOF MS durch Acetyl-geschützte Spaltstellen und Massenverschiebung eines Signals um + 42 Da auf eine Modifizierung hinweisen. In Kombination mit Western Blot Analysen von 2D Gelen unter Verwendung von Acetyl-Lysin spezifischen Antikörpern können so in kurzer Zeit eine Vielzahl von acetylierten Proteinen identifiziert und ihre Modifikationsstellen charakterisiert werden. Da die Protein-Acetylierung heute als Signalebene für die Kontrolle und Steuerung von Proteinfunktionen akzeptiert ist, wird so die Information über die Gegenwart eines Proteins in einem Proteom mit seiner möglichen biologischen Rolle verknüpft.

6.2 Die Acetylierung von Tat durch Acetyltransferasen

Es ist allgemein anerkannt, dass die transaktivierende Wirkung des HIV-1 Tat Proteins bei der Transkription auf der unter 2.1.4 erläuterten kooperativen Bindung von Tat und Cyclin T1 an die TAR RNA beruht. Wie eingangs beschrieben bewirkt die Bildung dieses ternären Komplexes die Rekrutierung von CDK9 zum transkriptionellen Initiationsort und ermöglicht die Umwandlung der RNA Polymerase II in die hyperphosphorylierte und damit elongationskompetente Form. Die Entdeckung der posttranslationalen Modifikation von Tat führte eine zusätzliche Regulationsebene in dieses Modell ein, und die Analyse der molekularen Details ist Gegenstand intensiver Forschung. Aus medizinischer Sicht hofft man dabei, diese Regulationsebene der Tat Funktion als therapeutisches Ziel nutzen zu können.

6.2.1 Die Acetylierung von Lysin 50 im Arginin-reichen Motiv von Tat durch p300

Das Tat Protein enthält zwölf Lysinreste in seiner Sequenz, darunter die zwei Doppellysinmotive an den Positionen 28 und 29 in der CRR und 50 und 51 im ARM sowie ein Dreifachlysinmotiv an den Positionen 88, 89 und 90 im C-Terminus. Wie allgemein bei der Charakterisierung von enzymatischen Acetylierungsstellen in Proteinen üblich, erfolgte auch die Untersuchung der Acetylierung des Tat Proteins zunächst durch Einbau von radioaktiv markierten Acetylgruppen und Western Blot Analysen nach *in vitro* Acetylierungsreaktion von synthetischen Tat Peptiden. Ausführliche Untersuchungen galten bisher der Acetylierung des hochkonservierten Lysinrestes in Position 50 von Tat, dem ersten Lysin im Doppellysinmotiv des ARM, durch p300 [Ott et al., 1999; Kiernan et al., 1999; Deng et al., 2000; Bres et al., 2002a; Kaehlcke et al., 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurde die beschriebene Acetylierung von Lysin 50 durch p300 auf Peptidebene und erstmals auch auf Proteinebene bestätigt. Hierzu erfolgte eine Erweiterung des zur Analyse der Tat Acetylierung angewandten Methodenspektrums um MALDI TOF

Massenspektrometrie, Lys-C Verdau und Edman Sequenzierung. Schwerpunkte der Untersuchungen waren dabei die Ermittlung der zur Lysin 50 Acetylierung durch p300 notwendigen Sequenzbedingungen, die Charakterisierung der zusätzlichen Acetylierung von Tat durch pCAF und die Aufklärung der enzymunabhängigen Tat Acetylierung durch die nichtenzymatische Cystein-Acetylierung [Dormeyer et al., 2003].

Die biologische Relevanz der Lysin 50 Acetylierung für die Tat Transaktivierung wurde durch zahlreiche Studien untermauert. Wie eingangs beschrieben, ist die Konservierung von Lysin 50 notwendig für die synergetische Aktivierung des HIV-1 LTR durch Tat und p300 [Ott et al., 1999; Kiernan et al., 1999]. Interessanterweise stört die Lysin 50 Acetylierung von Tat seine Bindung an Cyclin T1 und die TAR RNA und erleichtert seine Assoziation mit der hyperphosphorylierten Form der RNA Polymerase II [Kaehlcke et al., 2003]. Daraus ergibt sich, dass die Lysin 50 Acetylierung einen wichtigen regulatorischen Schritt innerhalb der HIV-1 Transkriptionselongation definiert, in dem sich Tat von der TAR RNA löst und direkt an die elongierende RNA Polymerase II bindet.

6.2.2 Die Acetylierung von Lysin 50 im Arginin-reichen Motiv von Tat durch pCAF

Zusätzlich zu der Dissoziation von Tat von Cyclin T1 und der TAR RNA ermöglicht die Acetylierung von Lysin 50 die spezifische Interaktion des Tat ARM mit der Bromodomäne der Acetyltransferase pCAF [Dorr et al., 2002; Mujtaba et al., 2002]. Wie die beobachtete Synergie von Tat und pCAF in der Transaktivierung des HIV-1 LTR beweist, ist diese Rekrutierung wichtig für die Tat Funktion. Wie Tat kann auch pCAF mit p300 assoziieren, so dass sich folglich mindestens zwei potente Acetyltransferasen im p300/pCAF-Transkriptionskomplex befinden. Zunächst wurde angenommen, dass diese doppelte Bereitsstellung von Acetyltransferase-Aktivität vorrangig der Gewährleistung der zur transkriptionellen Initiation und Elongation nötigen Histonacetylierung dient. Detaillierte Untersuchungen zeigten jedoch, dass Tat selbst Substrat der pCAF Acetyltransferase-Aktivität ist, was in der vorliegenden Arbeit erneut bestätigt werden konnte [Kiernan et al., 1999; Bres et al., 2002a; Bres et al., 2002b]. Anders als in der Literatur beschrieben wurde hier jedoch nicht Lysin 28 in der Tat CRR als Acetylierungsstelle von pCAF, sondern eindeutig Lysin 50 im Tat ARM identifiziert. Damit sind zur Acetylierung dieser Position in Tat drei verschiedene Acetyltransferasen, p300, Gcn5 und pCAF, befähigt. Die Sequenzen von pCAF und Gcn5 zeigen wie unter 2.2.3 beschrieben eine Homologie von etwa 70%, und die zellulären Funktionen der beiden GNAT-Acetyltransferasen entsprechen sich weitgehend. Funktionelle Redundanz mit pCAF wurde für die lange Form von Gcn5, auch pCAF-B genannt, beobachtet. Der kurzen Form von Gcn5 dagegen fehlt der

aminoternale Abschnitt, der in pCAF für die Assoziation mit p300 verantwortlich ist. p300 selbst zeigt nur in wenigen Regionen eine geringe Homologie zu pCAF oder Gcn5 und repräsentiert deshalb eine eigene Klasse von Acetyltransferasen.

Es ist erstaunlich, dass Tat an Lysin 50 sowohl durch p300 als auch durch pCAF acetyliert wird, da die Katalyse durch die beiden Enzyme wie eingangs beschrieben auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. pCAF bindet das Substrat und den Acetylgruppen-Donor AcCoA gleichzeitig in einem ternären Komplex und ermöglicht dadurch einen direkten Transfer der Acetylgruppe, wohingegen p300 das AcCoA und das Substrat nacheinander bindet und die Acetylgruppe in einem intermediären Zustand selbst übernimmt. Trotzdem wurde bereits von einer Reihe von gemeinsamen Substraten von p300/CBP und pCAF berichtet, darunter die Histone H3 und H4, HMG(Y), die Transkriptionsfaktoren p53, KLF13 und YY1, das adenovirale E1A Onkoprotein und der androgene Rezeptor. Die Acetylierungsstellen der beiden Enzyme in diesen Substraten überlappen zwar häufig, entsprechen sich aber nicht immer. So acetyliert pCAF Lysin 14 in Histon H3 und Lysin 8 in Histon H4, wohingegen p300/CBP zusätzlich Lysin 14 und 18 in Histon H3 und Lysin 5 und 8 in Histon H4 acetylieren kann [Sternier and Berger, 2000]. Im E1A Onkoprotein, in YY1 und im androgenen Rezeptor acetylieren p300/CBP und pCAF dieselben Lysinreste, in HMG(Y) und p53 jedoch unterschiedliche Lysinreste in verschiedenen Regionen der Proteine [Sakaguchi et al., 1998; Liu et al., 1999; Munshi et al., 1998; Munshi et al., 2001]. Für KLF13 wurde gezeigt, dass sich das Acetylierungsmuster von p300/CBP und pCAF teilweise überlappt, beide Enzyme aber zusätzlich weitere Lysine in spezifischer Weise acetylieren [Song et al., 2003]. Parallel dazu unterscheiden sich p300 und pCAF in ihrer funktionellen Rolle bei der Regulation der DNA-Bindung durch KLF13. Während p300/CBP die Assoziation mit der DNA unterbindet, verhindert pCAF die Acetylierung von KLF13 durch p300/CBP und schützt somit den bestehenden Komplex mit der DNA.

6.2.3 Die unterschiedlichen Funktionen von Tat in der HIV-1 Transkription nach Acetylierung durch p300 und pCAF

Die widersprüchlichen Ergebnisse, die zum einen Lysin 28, zum anderen Lysin 50 als Acetylierungsstelle von pCAF in Tat identifizierten, deuten auf ein überlappendes, aber nicht identisches Acetylierungsmuster von p300 und pCAF in Tat hin. Entsprechend wurde wie unter 2.1.4 erwähnt die Acetylierung von Lysin 50 für das Auseinanderfallen des ternären Tat/TAR/Cyclin T1 Komplexes verantwortlich gemacht, wohingegen pCAF die Interaktion von Tat mit Cyclin T1 stimulieren soll [Kiernan et al., 1999; Bres et al., 2002a]. Andererseits ist es

unwahrscheinlich, dass pCAF innerhalb eines Proteins eine weiter gefasste Substratspezifität als p300/CBP zeigt, da der katalytische Mechanismus von p300/CBP grundsätzlich eine sehr viel freiere Substratwahl erlaubt als der Mechanismus der GNAT-Acetyltransferasen. Zusätzlich konnte wie unter 5.4 dargestellt in der detaillierten *in vitro* Studie der Tat CRR keine spezifische Acetylierung von Lysin 28 nachgewiesen werden. Interessanterweise war die Acetylierung von Lysin 50 durch pCAF nur bei Verwendung eines 14 Aminosäuren langen Tat ARM Peptids zu beobachten, wohingegen für die Acetylierung durch p300 bereits ein neun Aminosäuren kurzes Peptid ausreichte. Das bestätigt zum einen, dass pCAF zur spezifischen Lysin-Acetylierung eine strengere Einhaltung bestimmter, bisher ungeklärter Sequenzbedingungen erfordert als p300. Zum anderen erklärt die Verwendung von kurzen ARM Peptiden, warum in bisherigen Untersuchungen der Tat Acetylierung durch pCAF keine Acetylierung von Lysin 50 beobachtet wurde.

Die Tatsache, dass Lysin 50 im Tat ARM durch mehrere Acetyltransferasen acetyliert werden kann, wirft Fragen bezüglich der grundsätzlichen Bedeutung einer solchen Enzympluralität und der physiologischen Relevanz der einzelnen Acetyltransferasen auf. Wie die Fraktionierung von HeLa Zellextrakten gezeigt hat, assoziiert p300 mit der zur Elongation unfähigen hypophosphorylierten Form des humanen RNA Polymerase II Komplexes, wohingegen pCAF an die elongationskompetente hyperphosphorylierte Form bindet [Cho et al., 1998]. Diese Beobachtung macht es wahrscheinlich, dass die initiale Acetylierung von Lysin 50 im Tat ARM durch p300 erfolgt. Für die biologische Relevanz einer initialen Tat Acetylierung durch p300 spricht, dass die transaktivierende Wirkung von Tat auf den HIV-1 Promotor mit Lys-CoA, einem selektiven Inhibitor von p300 [Lau et al., 2000a], oder durch p300-spezifische siRNA (small interfering ribonuleic acid) unterdrückt werden kann [Kaehlcke et al., 2003]. Der Effekt von Lys-CoA kann durch die direkte nukleäre Mikroinjektion von synthetisch an Lysin 50 acetyliertem Tat Protein aufgehoben werden.

Das Lysin 50 wird an der Tat-Oberfläche zwischen dem TAR RNA-Bindungsmotiv und der CRR von Tat exponiert [Peloponese et al., 2000] und als Schlüssel-Aminosäure an der Schnittstelle der transaktivierenden Region von Tat, der TAR RNA Schleife und Cyclin T1 angesehen [Richter et al., 2002]. Die Acetylierung von Lysin 50 kann zwar im Kontext des ternären Komplexes aus Tat, TAR und Cyclin T1 erfolgen, jedoch verliert das an Lysin 50 acetylierte Tat seine Fähigkeit zur Assoziation mit der TAR RNA [Mujtaba et al., 2002], wahrscheinlich aufgrund einer Zerstörung der Kontaktfläche. Möglicherweise liegt deshalb der biologische Sinn der Lysin 50-Acetylierung durch p300 in der erleichterten Bindung des von der TAR RNA dissoziierten Tat Proteins an die pCAF-Bromodomäne und damit in der verstärkten Rekrutierung des entstehenden Tat/pCAF Komplexes zum funktionellen

Transkriptionskomplex. Tatsächlich wurden sowohl Tat als auch pCAF in Assoziation mit dem elongierenden RNA Polymerase II Komplex gefunden [Keen et al., 1997].

Die Lysin 50-gerichtete Acetyltransferase-Aktivität von pCAF innerhalb des Komplexes könnte die reversible Deacetylierung von Tat durch Deacetylasen und damit den vorzeitigen Elongationsabbruch verhindern. Damit sorgte pCAF für die Gewährleistung der zur eigenen Bindung nötigen molekularen Voraussetzungen. Dass die transkriptionelle Synergie von Tat und pCAF sowohl auf der Konservierung von Lysin 50 im Tat ARM als auch auf einer intakten Acetyltransferase-Domäne von pCAF beruht [Benkirane et al., 1998], weist auf eine mögliche biologische Rolle von pCAF für die transaktivierende Wirkung von Tat in der Transkription hin. pCAF wird selbst durch Autokatalyse oder von p300 an mehreren Lysinresten in seinem aminoterminalen Sequenzabschnitt acetyliert, wobei die Autoacetylierung intra- und intermolekular erfolgen kann [Santos-Rosa et al., 2003]. Die Acetylierung von pCAF erhöht sowohl die Proteinstabilität als auch die Acetyltransferaseaktivität. Der erwiesene superinduzierende Effekt von p300 auf die Tat Aktivität könnte somit auch auf der Acetylierung von pCAF selbst beruhen und damit indirekt zur Acetylierung von Lysin 50 führen. In Übereinstimmung damit erfordert die Steigerung der Tat Transaktivität durch p300 auch die Konservierung des Lysin 50 im Tat ARM. Deshalb ist zu vermuten, dass *in vivo* beide Acetyltransferasen, p300 und pCAF, die Acetylierung von Lysin 50 im Tat ARM bewirken und dass die Modifikation durch beide Enzyme wichtige, aber unterschiedliche Rollen während des Ablaufs des Transkriptionszyklus spielen.

Insgesamt favorisieren die Ergebnisse dieser Arbeit ein zweistufiges Modell, in dem p300 für die initiale Lysin 50-Acetylierung und damit für die Überwindung des verfrühten Elongationsabbruchs der Transkripte verantwortlich ist, wohingegen pCAF die Aufrechterhaltung der Lysin 50-Acetylierung während des gesamten Transkriptionszyklus gewährleistet (Abb. 6.1). Mit dieser Hypothese stimmt das unter 5.1.4 dargestellte Ergebnis überein, dass Asparaginsäure- und Glutaminsäure-Mutationen von Glycin 48 im Tat ARM, die die Acetylierung von Lysin 50 durch p300 verhindern, zu einer dramatischen, aber nicht vollständigen Abnahme der transaktivierenden Wirkung von Tat auf den HIV-1 LTR führen. Diese Beobachtung bestätigt zum einen, dass Lysin 50 im Tat ARM das direkte Ziel der Acetyltransferase-Aktivität von p300 ist und dass diese initiale Acetylierung für die transaktivierende Wirkung von Tat notwendig ist. Zum anderen beruht die restliche Transaktivität der Mutanten wahrscheinlich auf der Acetylierung von Lysin 50 durch eine weitere Acetyltransferase wie Gcn5 oder pCAF, deren Funktion durch die Glycin 48-Mutation unbeeinflusst bleibt.

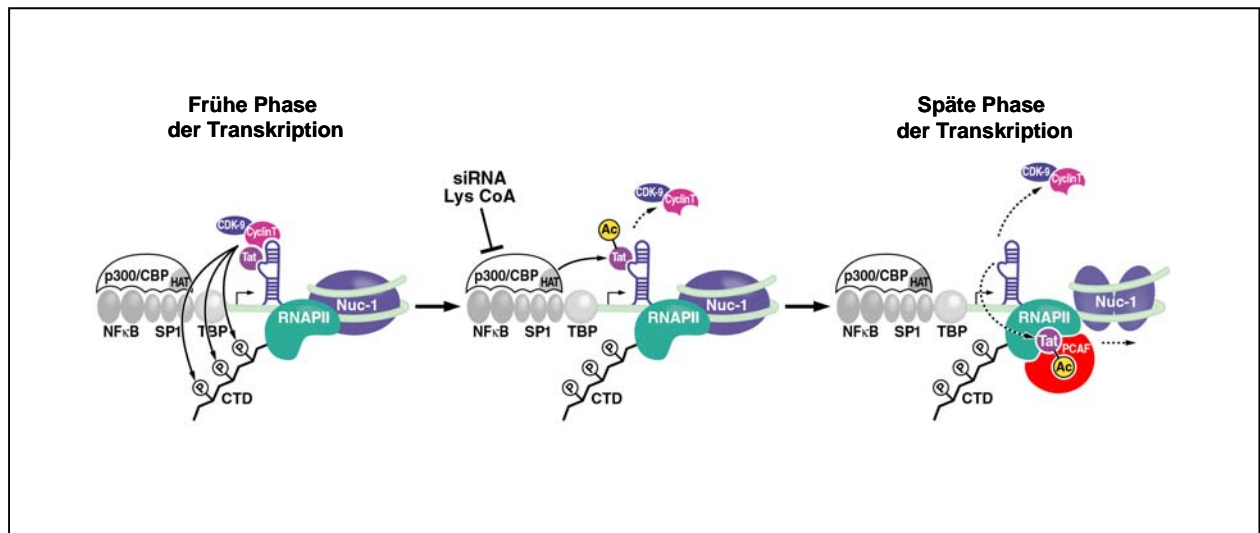


Abb. 6.1: Zweistufiges Modell der transaktivierenden Wirkung von Tat in der HIV-1 Transkription. In der frühen Phase der Transkription rekrutiert das unmodifizierte Tat den pTEFb-Komplex aus Cyclin T1 und CDK9 zur TAR RNA, so dass CDK9 die carboxyterminale Domäne der RNA Polymerase II phosphorylieren und damit in die effizient elongierende Form umwandeln kann. Nach Acetylierung von Lysin 50 im Tat ARM durch p300 dissoziiert der ternäre Tat/TAR/Cyclin T1-Komplex und das freiwerdende acetylierte Tat rekrutiert in der späten Phase der Transkription pCAF zur elongierenden RNA Polymerase II. Dort sorgt pCAF für die Aufrechterhaltung der Lysin 50-Acetylierung während des gesamten Transkriptionszyklus und verhindert so einen vorzeitigen Elongationsabbruch.

6.2.4 Die Auswirkungen der Lysin 50 Acetylierung auf die molekularen Eigenschaften von Tat

Die Acetylierung von Lysin 50 im Tat ARM kann einen Einfluss auf jede der biologischen Funktionen haben, die mit dieser Region in Verbindung stehen, einschließlich der Bindung der TAR RNA, des nukleären Imports und der Proteininstabilität von Tat. Als Schlüsselaminosäure der Interaktion mit der TAR RNA gilt Arginin 52, aber auch die Acetylierung der Lysine 50 und 51 einzeln und in Kombination zeigen einen negativen Einfluss auf die Interaktion [Deng et al., 2000]. Für die nukleäre Lokalisation von Tat ist der fünf Aminosäuren kurze Abschnitt $^{48}\text{GRKKR}^{52}$ notwendig und hinreichend [Ruben et al., 1989; Siomi et al., 1990], aber Vergleichsstudien mit den nukleären Lokalisationssignalen (NLS) anderer Proteine und Mutationsstudien des Tat ARM weisen darauf hin, dass auch das Dreifachargininmotiv in Position 55-57 am Transport des Proteins in den Zellkern beteiligt ist [Hauber et al., 1989]. Zusätzlich zeigt das Tat ARM eine bemerkenswerte Sequenzhomologie mit den zwei benachbarten Sequenzen des Rex Proteins des humanen T-Zell Leukämievirus (HTLV-1), die für die nukleäre und die nukleoläre Lokalisation des Proteins verantwortlich sind [Siomi et al., 1988]. Interessanterweise wurde auch für Tat beobachtet, dass es in exprimierenden Zellen vorzugsweise in den Nukleoli akkumuliert [Ruben et al., 1989; Hauber et al., 1987]. Die Stabilität des Tat Proteins scheint mit seinem Transport in den Nukleus und Nukleolus oder den

dafür verantwortlichen Aminosäureresten in Zusammenhang zu stehen, denn nukleäre Tat ARM Mutanten zeigten in Transfektionsstudien Halbwertzeiten, die denen des Wildtypproteins entsprachen, wohingegen im Cytoplasma verbleibende Mutanten nur für kurze Zeit detektierbar waren.

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Tat ARM Mutanten hatten die in dieser Arbeit verwendeten Asparaginsäure- und Glutaminsäuremutanten von Tat, die eine Acetylierung von Lysin 50 verhinderten und in Transfektionsstudien eine dramatisch verringerte Transaktivierung des LTR Promotors aufwiesen, keinen Einfluss auf weitere Funktionen des Tat Proteins, die auf dem Tat ARM beruhen. Sie lagen in einer dem Wildtyp Protein vergleichbaren Konzentration im Kern vor, assoziierten mit hoher Effizienz mit der TAR RNA und zeigten eine basale transaktivierende Wirkung. Da das mutierte Glycin 48 zwischen der cofaktorbindenden CRR und dem ARM liegt, wurde zusätzlich sichergestellt, dass auch die Bindung an Cyclin T1 ungehindert erfolgen konnte.

Da die erzeugten Tat Mutanten somit ausschließlich die Acetylierung des ARM inhibieren, ohne wie andere Mutationen in dieser Region weitere Proteinfunktionen zu beeinflussen, können sie von hohem Nutzen für die weitere Erforschung der transaktivierenden Wirkung von Tat sein. Wie zu Beginn erläutert, stellt die Acetylierung von Tat zusammen mit eventuellen anderen posttranslationalen Modifikationen eine Regulationsebene der HIV-1 Transkription dar. Das gezielte Ausschalten der Tat Acetylierung und die molekulare Analyse der biologischen Folgen versprechen weiteren Einblick in die Eignung von Tat als therapeutisches Zielprotein.

Insgesamt stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Vorstellung, dass die enzymatische Acetylierung des Tat ARM als molekularer Schalter zwischen der frühen, TAR-abhängigen und der späten, TAR-unabhängigen Phase der transkriptionellen Elongation dient. Daneben ist jedoch eine weitere Funktion dieser Modifikation vorstellbar, die auf der einzigartigen Eigenschaft von Tat beruht, an das primäre Transkript zu binden. Die Konzentration der zur Verfügung stehenden Tat Moleküle nimmt wegen dieser Bindung mit der Zahl der ablaufenden Transkriptionszyklen ab. Klassische Transkriptionsfaktoren dagegen gehen eine stabile Assoziation mit der DNA ein und rekrutieren dann sukzessive RNA Polymerase Komplexe zum Transkriptionsort. Die Lysin 50-Acetylierung von Tat führt wie oben erläutert zur Dissoziation des ternären Komplexes aus Tat, TAR RNA und Cyclin T1 und setzt damit das Tat Molekül für den Transkriptionskomplex des nächsten Zyklus frei („Tat Recycling“), insofern es nicht die Assoziation mit pCAF eingeht. Eine erneute kooperative Bindung der TAR RNA und des Cofaktors Cyclin T1, die zur Rekrutierung der CDK9 zum transkriptionellen Initiationsort und damit zur Umwandlung der RNA Polymerase II in die elongationskompetente Form notwendig ist, erfordert die vorangehende Deacetylierung des freigesetzten Tat Moleküls. Es erscheint

deshalb vielversprechend, eine mögliche Interaktion von Tat mit spezifischen Deacetylasen und deren katalytische Aktivität auf das acetylierte Lysin 50 zu untersuchen. Anders als bei Histonen, bei denen eine Deacetylierung eine erniedrigte transkriptionelle Aktivität bedeutet, sollten im Fall von Tat Deacetylasen als positive Transkriptionsfaktoren fungieren, da erst die Deacetylierung des freigesetzten Tat Moleküls den Beginn eines neuen Transkriptionszyklus ermöglicht.

6.3 Die nichtenzymatische Acetylierung von Tat

6.3.1 Die nichtenzymatische Acetylierung von Cysteinen in der Cystein-reichen Region von Tat

Wie einleitend erwähnt, trägt das Tat Protein zusätzlich zum ARM ein zweites Doppellysinmotiv in der CRR. Auf dem Einbau von radioaktiv markierten Acetylgruppen in synthetische CRR Peptide basierend wurde berichtet, dass das in Position 28 befindliche Lysin durch pCAF acetyliert wird [Kiernan et al., 1999]. Diese Modifizierung steht scheinbar in Zusammenhang mit der verstärkten Bindung des p-TEFb Komplexes an die transaktivierende Region von Tat.

In dieser Arbeit konnte keine enzymatische Acetylierung der Lysine der Tat CRR durch pCAF oder p300 beobachtet werden. Die detaillierte Analyse dieser Tat Region erfolgte unter Verwendung von synthetischen Tat CRR Peptiden mittels biochemischer Methoden, deren Funktionalität zur Analyse von Lysin-Acetylierungen anhand der vorangegangenen Studien über die Acetylierung der Tat ARM bewiesen wurde. Anders als beim *in vitro* Einbau von radioaktiv markierten Acetylgruppen kann im MALDI TOF MS Spektrum die absolute Zahl der an ein Peptid gebundenen Acetylgruppen bestimmt werden, solange die Konzentration des acetylierten Peptids über der Detektionsgrenze liegt. Da die CRR nur zwei Lysinreste enthält, jedoch eine bis zu vierfache Acetylierung dieser Region detektiert wurde, konnte es sich von vorneherein nicht um eine ausschließliche Lysin-Acetylierung handeln. Vielmehr zeigte sich durch eine Reihe von Untersuchungen an synthetischen Wildtyp- und Mutanten-Peptiden der Tat CRR, dass die multiple Acetylierung nicht auf einer enzymatischen Lysin-Acetylierung durch pCAF oder p300, sondern allein auf einer nichtenzymatischen Transferreaktion von Acetylgruppen von AcCoA auf Tat beruht. Mittels MALDI TOF MS konnten eindeutig die Cysteinreste der Tat CRR als Acetylgruppen-Akzeptoren identifiziert werden [Dormeyer et al., 2003].

Cysteine tragen in ihrer Seitenkette eine reaktive Sulfhydrylgruppe, die in S-Acylierungsreaktionen als Akzeptor von langkettigen Fettsäuren dienen kann [Schultz et al., 1988; Quesnel and Silvius, 1994]. Eine gleichartige Akzeptorfunktion kann für S-

Acetylierungsreaktionen angenommen werden. Als überzeugendes Beispiel für ein S-acetyliertes Molekül kann der hier verwendete Acetylgruppendonor AcCoA selbst betrachtet werden, in dem die Acetylgruppe als Thioester gebunden vorliegt. Eine solche Bindung von Acetylgruppen an die freien Sulfhydrylgruppen in Cysteinen beruht ausschließlich auf deren Zugänglichkeit und kann wie in dieser Arbeit gezeigt in allen cysteinhaltigen Peptiden unabhängig von ihrer Sequenz erfolgen.

6.3.2 Die Beachtung der nichtenzymatischen Cystein-Acetylierung bei der Charakterisierung von Acetylierungsstellen in Proteinen

Die Identifizierung von Cysteinresten als enzym- und sequenzunabhängige Acetylgruppen-Akzeptoren hat weitreichende methodische Konsequenzen, da die Charakterisierung von enzymatischen Acetylierungsstellen zumeist durch die *in vitro* Acetylierung von synthetischen Peptiden oder Proteinen unter der Annahme erfolgt, dass Lysine die einzigen acetylierbaren Reste sind. Die Vernachlässigung der nichtenzymatischen Cystein-Acetylierung in Kombination mit fehlenden negativen Kontrollansätzen kann deshalb zu falsch-positiven Ergebnissen bei der Interpretation von *in vitro* Acetylierungen führen. So ist die fälschlicherweise als Autoacetylierung bezeichnete Acetylierung von Tat in Abwesenheit von Acetyltransferasen [Deng et al., 2001] eine Folge der Cystein-Acetylierung der CRR. Sie muss klar von einer tatsächlichen Autoacetylierung, bei der Tat gegenüber sich selbst eine enzymatische Funktion übernimmt, unterschieden werden. Auch bei der unter 5.2.1 erläuterten Erstellung der Liste von p300 Substraten konnte bei einer Reihe von Proteinen nicht eindeutig entschieden werden, ob es sich um eine enzymatische Lysin- oder eine nichtenzymatische Cystein-Acetylierung handelte. Zusätzliche Kontrollansätze der *in vitro* Acetylierungsreaktionen der jeweiligen Substrate und eine neue Interpretation der Ergebnisse unter Beachtung des Cysteingehalts der Peptide erscheinen hier notwendig. Besonderen Wert auf Kontrollen muss bei Peptiden gelegt werden, die mehr als ein Cystein enthalten, da hier wie im Fall der Acetylierung von Lysin 28 in der Tat CRR die Zahl der Cysteinreste die Interpretation des Acetylierungsmusters erschwert. Bei der MALDI TOF MS Analyse solcher Peptide muss zusätzlich bedacht werden, dass die Matrixmoleküle der α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure mit dem Peptid eine labile Verbindung eingehen können, deren Signal im Originalspektrum nicht zu detektieren ist, aber zu metastabilen Zerfällen führt. Darauf beruhende Signale erhöhen die Komplexität des Spektrums und konnten durch eine kontrollierende Präparation mit Dihydroxybenzoesäure vermieden und damit identifiziert werden (ohne Abb.).

Ein direkter Nachweis der Cystein-Acetylierung von Peptiden ist gegebenenfalls durch MALDI-Fragmentationsanalyse (PSD) oder ESI-MS/MS Studien möglich. Aufgrund ihrer spezifischen Sequenz konnten jedoch im Falle der verwendeten Tat ARM und CRR Peptide mit keiner der beiden Methoden signifikante Ionenserie detektiert werden. Die Tat CRR Peptide wurden selbst in aminoterminal biotinylierter Form nur ungenügend ionisiert, wie es oft der Fall für Cystein-haltige Peptide ist [Kratzer et al., 1998], wohingegen der basische Charakter der Tat ARM Peptide zu einer starken internen Fragmentierung und damit zum Verlust der aussagekräftigen b- und y-Ionenserien führte.

6.3.3 Die möglichen Funktionen von Tat nach nichtenzymatischer Acetylierung der Cystein-reichen Region

Der Vergleich der Bindungsart der Acetylgruppe in AcCoA und Acetyl-Cystein wirft die Frage auf, ob Cystein-acetyliertes Tat selbst als Acetylgruppen-Donor fungieren könnte. Tatsächlich zeigten erste *in vitro* Transacetylierungsstudien, dass pCAF spezifisch Acetylgruppen von der acetylierten Tat CRR auf die Lysine von Histonpeptiden übertragen kann. Es ist bekannt, dass verschiedene cytoplasmatische Acetyltransferasen einschließlich der Arylamin-N-Acetyltransferasen die Acetylgruppen von AcCoA auf das Substrat über die Bildung eines Cystein-acetylierten Intermediats übertragen [Andres et al., 1988; Upton et al., 2001]. Auch die biologische Claisen-Kondensation von zwei AcCoA-Molekülen zu Acetoacetyl-CoA, die im ersten Schritt der Synthese von Ketonkörpern, Cholesterin und Steroidhormonen abläuft und von biosynthetischen Thiolasen katalysiert wird, schließt ein Acetyl-Cystein Zwischenprodukt des Enzyms ein [Modis and Wierenga, 1999]. Interessanterweise wurde kürzlich berichtet, dass die Histon-Acetylierung durch die Esa1 Acetyltransferase aus Hefe auf einem Ping-Pong-Katalysemechanismus basiert, in den ein konservierter Cysteinrest in der aktiven Tasche des Enzyms involviert ist [Yan et al., 2002]. Hierbei wird die Acetylgruppe von AcCoA zunächst auf das konservierte Cystein der Esa1 Acetyltransferase und von dort aus weiter auf das Histonsubstrat übertragen.

Die nichtenzymatische Cystein-Acetylierung von Tat findet in einer funktionell wichtigen Proteinregion, der transaktivierenden Region, statt. Es ist vorstellbar, dass Tat *in vivo* als Speicher von reaktiven Acetylgruppen fungiert und bei der enzymatischen Acetylierung von Histonen, transkriptionellen Cofaktoren oder sich selbst als zusätzliches Acetyl-Coenzym dient. Damit würde der Vorrat an reaktiven Acetylgruppen, die sich in direkter Nähe zum Promotor befinden, erhöht und die zur erfolgreichen Transkription notwendige Acetylierung von Histonen und Cofaktoren von der permanenten Rekrutierung von AcCoA-Molekülen entkoppelt. Dafür

spricht, dass die enzymatische Lysin-Acetylierung von Histonen und der p50-Untereinheit von NF κ B durch die Gegenwart von Tat verstärkt wird [Bres et al., 2002; Furia et al., 2002]. In diesen Studien könnte Tat Acetylgruppen von AcCoA übernommen und sie mit gesteigerter Effektivität für die nachfolgenden Acetylierungsreaktionen bereitgestellt haben.

Eine Funktion von Tat als Acetyl-Coenzym würde auch eine Vielzahl der Effekte erklären, die Tat auf verschiedene zelluläre Promotoren ausübt. Es erscheint deshalb vielversprechend, die Untersuchungen der nichtenzymatischen Acetylierung der Tat CRR und der eventuellen neuen Rolle von Tat als Acetyl-Coenzym auf Transaktivierungsstudien mit dem vollständigen Tat Protein und die *in vivo* Detektion der CRR Acetylierung auszuweiten.

6.4 Die Substratspezifität von Acetyltransferasen

Wie einleitend ausgeführt, wurden bis heute 20 Proteine mit intrinsischer Acetyltransferase-Aktivität identifiziert, die sich nicht nur in ihren Strukturen, Mechanismen und biologischen Funktionen, sondern auch in ihren Substratspezifitäten unterscheiden. Es ist jedoch unklar, welche molekularen Voraussetzungen zur enzymatischen Acetylierung eines Lysinrestes in einem Protein notwendig sind, und bisher konnte für keine der bekannten Acetyltransferasen eine Konsensussequenz der Acetylierungsstelle gefunden werden. Zwar nimmt die Zahl der identifizierten Acetyltransferasesubstrate seit Entdeckung der ersten enzymatisch acetylierten Nicht-Histon Proteine stetig zu, doch die Substratspektren der einzelnen Acetyltransferasen zeigen eine hohe Divergenz bezüglich der die Acetylierungsstellen umgebenden Sequenzen. Mit der Erkenntnis, dass die spezifische Lysin-Acetylierung eine ebenso hohe biologische Relevanz besitzt wie die spezifische Serin-, Threonin-, Tyrosin- oder Histidin-Phosphorylierung steigt aber auch der Bedarf nach einer Konsensussequenz. Wie bei der Erforschung von Protein-Phosphorylierungen durch Kinasen kann die Kenntnis einer solchen die Reaktion begünstigenden Sequenz auch bei der Charakterisierung von Protein-Acetylierungen durch Acetyltransferasen von Nutzen sein, da so in kurzer Zeit potentielle Substrate gefunden und die vermutlichen Acetylierungsstellen gezielt analysiert werden können.

6.4.1 Die Suche nach einer Konsensussequenz der Acetylierung durch p300

Trotz der weiten Substratspezifität von p300 und der hohen Anzahl an bekannten Substraten dieser Acetyltransferase existieren keine offensichtlichen gemeinsamen Sequenzmotive in den acetylierten Proteinen. Zwar wurden verschiedene die Acetylierung begünstigende Sequenzen charakterisiert, doch treffen diese jeweils nur auf eine begrenzte Zahl der p300 Substrate zu. So

wurde gezeigt, dass in vielen Substraten Serin- oder Glycinreste in Position Lys-1 für die Lysin-Acetylierung durch p300 notwendig sind [Bannister and Miska, 2000], und tatsächlich besitzen 23% der bekannten Substrate von p300 eine solche Sequenz G/S ^{ac}K (Anhang 7.4). Die Datenbanksuche nach neuen Substraten mit Peptiden, deren Aminosäuren nur in diesen zwei Positionen spezifiziert sind, ist jedoch nicht möglich, zumal Serin, Lysin und Glycin zu den fünf häufigsten Aminosäureresten in Proteinen gehören (Anhang 7.5). Die gleichen Einschränkungen gelten für die Beobachtung, dass häufig Lysin- und Argininreste in Position Lys-2 der Substrate auftreten [Gu and Roeder, 1997], da hierbei der Aminosäurerest in Position Lys-1 unspezifiziert bleibt. 15% der bekannten Substrate besitzen eine Sequenz K/R X ^{ac}K und nur 3% erfüllen die zusätzliche Bedingung, dass das acetylierte Lysin in einem Doppellysinmotiv liegen sollte.

Wie unter 2.2.2 erläutert, weisen mechanistische Studien darauf hin, dass bei der Substraterkennung durch p300 eine Präferenz für einen positiv geladenen oder hydrogenbindenden Rest in Position Lys-3 oder Lys+4 besteht [Thompson et al., 2001], was auf 44% der bekannten Substratproteine zutrifft. Weitere 37% tragen positiv geladene Reste in Position Lys+2 oder Lys+3 und werden wahrscheinlich von p300 mit geringerer Effizienz acetyliert. Damit erfüllen 81% der bekannten Substrate die Voraussetzung, dass an bestimmten Positionen um die Acetylierungsstelle eine positive Ladung vorhanden sein muss, um eine katalytische Umsetzung durch p300 zu ermöglichen. Diese vielversprechende Beobachtung kann zwar bei der Überprüfung von potentiellen neuen Substraten von p300 nützlich sein, ermöglicht aber wiederum nicht die direkte Substratsuche in Datenbanken, da sich auch hierbei die Aminosäurespezifizierung auf einzelne Positionen beschränkt.

Die fehlgeschlagene Suche nach einer eindeutigen Konsensussequenz der Acetylierung durch p300, die Analyse möglicher Sekundärstrukturen in der Umgebung der Acetylierungsstellen und die Annahme, dass die Katalyse der Lysin-Acetylierung durch p300 wie unter 2.2.2 beschrieben einem „Ping-Pong“-Mechanismus unterliegt, weisen darauf hin, dass p300 seine Substrate aufgrund mehrerer verschiedener Kombinationen bestimmter Aminosäuren erkennt. Für die direkt um die Acetylierungsstelle liegenden Positionen betrifft dies wie unter 5.2.1 gezeigt die folgenden Aminosäuren:

Lys-4	Lys-3	Lys-2	Lys-1	Lys+1	Lys+2	Lys+3	Lys+4
K/P/S	K/P/R/W/G/A	P/G/S/R/K/M	G/R/P/A/K	^{ac} K	R/K/G	K/R/P	R/K/Y/G
							K/E/A

Innerhalb dieser Kombinationen können die oben genannten Präferenzmotive wie Glycinreste in Position Lys-1, Lysin- oder Argininreste in Position Lys-2, positiv geladene Reste in Positionen Lys-3, Lys+4, Lys+2 oder Lys+3 und auch die Einbettung der Acetylierungsstelle in

Doppellysinmotive wiedererkannt werden. Von Vorteil ist, dass aus diesen Aminosäurekombinationen konstruierte hypothetische Substratsequenzen wie unter 5.2.3 gezeigt direkt zur Suche nach potentiellen Substraten von p300 in Proteindatenbanken verwendet werden können. Ebenso veranschaulichen sie wie unter 5.2.2 dargestellt, dass durch Mutation von Peptiden artifizielle Acetylierungsstellen von p300 erzeugt werden können, die mitunter zur fehlerhaften Interpretation von *in vitro* Acetylierungsreaktionen führen. Die Kenntnis der „Konsensuskombinationen“ sollte deshalb auch bei der Synthese von Mutantenpeptiden für Acetylierungsstudien von p300 genutzt werden.

Die 20 proteinogenen Aminosäuren besitzen spezifische Eigenschaften, auf denen ihre jeweiligen Funktionen beruhen. So gehören Lysine und Arginine zu den Aminosäuren mit positiv geladenen polaren Seitenketten, und ihre auffallende Häufigkeit in allen Positionen um die Acetylierungsstellen von p300 weist daraufhin, dass eine positiv geladene Umgebungssequenz die Acetylierung eines Lysins begünstigt. Dagegen treten die negativ geladenen Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure nur selten in der Nähe einer Acetylierungsstelle auf, und auch die unter 5.1.3 gezeigte Inhibierung der Acetylierung von Lysin 50 im Tat ARM durch diese Aminosäurereste lässt darauf schließen, dass eine negative Umgebungssequenz die katalytische Reaktion von p300 unterbindet. Davon ausgenommen ist Position Lys+4, in der Glutaminsäure, nicht aber Asparaginsäure mit einer stark erhöhten Häufigkeit auftritt. Die beiden negativ geladenen Aminosäuren unterscheiden sich bezüglich ihres Vorkommens in Sekundärstrukturelementen von Proteinen. So soll Glutaminsäure die Bildung von α -Helices begünstigen, wohingegen Asparaginsäure die Entstehung von β -Schleifen fördert und damit α -Helices bricht [Creighton, 1983]. Interessanterweise zeigt Position Lys+4 ein eingeschränktes Aminosäurespektrum gegenüber den anderen Positionen, wobei jede der drei an dieser Position häufig vorkommenden Aminosäuren Lysin, Asparaginsäure und Alanin als α -Helixbildner bekannt ist. Der Ausschluss der zweiten negativ geladenen Aminosäure Asparaginsäure und der zweiten positiv geladenen Aminosäure Arginin weisen zusätzlich darauf hin, dass ein wichtiges Kriterium für die Aminosäurewahl in Position Lys+4 die Fähigkeit zur α -Helixbildung und nicht der polare geladene Charakter ist. Auch für das Tat ARM wurde durch computergestützte Analyse eine Präferenz zur Bildung einer α -Helix vorhergesagt, an deren Ende die Acetylierungsstelle Lysin 50 durch den helixbrechenden Charakter des Glycins in Position 48 exponiert wird, und Interaktionsstudien von Tat und p300/CBP weisen darauf hin, dass Tat nach Bindung der Acetyltransferase tatsächlich eine Helixstruktur einnimmt [Vendel and Lumb, 2003]. In Einklang damit steht das häufige Auftreten von Prolin in der direkten Umgebung der Acetylierungsstellen von p300, da Prolin durch seine starre Iminosäurestruktur ebenfalls als Helixbrecher gilt. Möglicherweise begünstigt die Exposition eines Lysinrestes am

Ende einer α -Helix wie in Tat seine Acetylierung durch p300. In Proteinsequenzen, die leicht die Sekundärstruktur von α -Helices annehmen, könnte dann die Anwesenheit von Glycinen oder Prolinen für den Bruch der α -Helix und die nötige Exposition der Acetylierungsstelle verantwortlich sein. Unter dem Aspekt des α -Helixabbruches könnte auch das häufige Auftreten von Tryptophan, der seltensten der 20 proteinogenen Aminosäuren, in Position Lys-3 erklärt werden. Tryptophan ist wie Arginin bekannt für seine Funktion als Wasserstoffdonor und Wasserstoffbrückenbildner, und sowohl Prolin als auch Tryptophan begünstigen die Bildung von β -Haarnadelschleifen, welche in Proteinen oft in Supersekundärstrukturen beim Übergang von einer Sekundärstruktur wie einer α -Helix oder einem β -Faltblatt in eine andere zu finden sind. In diesem strukturellen Zusammenhang ist interessant, dass Tat wie unter 6.2.4 erläutert in dem für die nukleäre und nukleoläre Lokalisation verantwortlichen Bereich acetyliert wird, da sich das NLS von Proteinen im allgemeinen aus einer kurzen Sequenz aus basischen Aminosäureresten wie Lysin oder Arginin flankiert von einem oder mehreren helixbrechenden Aminosäuren wie Glycin oder Prolin zusammensetzt und *in vivo* eine kurze, hochbasische α -Helix bildet [Ruben et al., 1989].

Die Hypothese, dass die Acetylierungsstellen von p300 in Proteinen durch das Aufbrechen einer α -Helix oder innerhalb von Supersekundärstrukturen exponiert werden, bedeutet allgemein, dass sich die Suche nach einer Konsensussequenz weniger auf die einzelnen Reste selbst, sondern vielmehr auf ihren Einfluss auf die Bildung von Sekundärstrukturelementen konzentrieren muss. Ein erster Vergleich der für die einzelnen Substrate von p300 vorhergesagten Sekundärstrukturen ergab tatsächlich eine leichte Präferenz von α -Helices, bestätigte jedoch nicht die Exposition der Acetylierungsstelle, da sich die vorhergesagten Sekundärstrukturen allein auf α -Helices und β -Faltblätter beschränkten. Daten aus der NMR-Spektroskopie oder der Kristallstrukturanalyse wurden bisher nicht herangezogen, doch es erscheint vielversprechend, die Sekundärstrukturen der Substrate von p300 im Detail zu charakterisieren und zu vergleichen, um weitere Einsichten in die strukturellen Voraussetzungen für die Acetylierung von Proteinen durch p300 zu gewinnen.

7 Anhang

7.1 Verwendete Peptide

Region	Aminosäuren	Sequenz	Mutation / Modifizierung
Tat N-Terminus	1-21	MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTA	
Tat CRR	22-35	CTNCYCKKCCFHCQ	
Tat CRR	22-35	Biotin-CTNCYCKKCCFHCQ	N-terminal biotinyliert
Tat CRR	22-35	CTNCYCAACCFHCQ	KK28 29AA
Tat CRR	22-35	C ^{acm} TNC ^{acm} YC ^{acm} KKC ^{acm} C ^{acm} FHC ^{acm} Q	C22 25 27 30 31 34 ^{acm} C
Tat CRR	22-35	NTCFKCCCHKCYQC	willkürliche Sequenz
Tat Kernregion	35-48	QVCFITKALGISYG	
Tat Kernregion	35-48	QVCFITAALGISYG	K41A
Tat Kernregion	35-48	QVC ^{acm} FITKALGISYG	C37 ^{acm} C
Tat ARM	45-53	ISYGRKKRR	
Tat ARM	45-53	ISAGRKKRR	Y47A
Tat ARM	45-53	ISDGRKKRR	Y47D
Tat ARM	45-53	ISEGRKKRR	Y47E
Tat ARM	45-53	ISYARKKRR	G48A
Tat ARM	45-53	ISYDRKKRR	G48D
Tat ARM	45-53	ISYERKKRR	G48E
Tat ARM	45-53	ISYGAKKRR	R49A
Tat ARM	45-53	ISYGDKKRR	R49D
Tat ARM	45-53	ISYGEKKRR	R49E
Tat ARM	45-53	ISYGGKKRR	R49G
Tat ARM	45-53	ISYGKKKRR	R49K
Tat ARM	45-53	ISYGCKKRR	R49C
Tat ARM	45-53	ISYGC ^{acm} KKRR	R49 ^{acm} C
Tat ARM	45-53	ISYGCAARR	R49C & KK50 51AA
Tat ARM	45-53	ISYGC ^{acm} AARR	R49 ^{acm} C & KK50 51AA
Tat ARM	45-53	ISYGRKKAR	R52A
Tat ARM	45-53	ISYGRKKDR	R52D
Tat ARM	45-53	ISYGRKKER	R52E
Tat ARM	45-58	ISYGRKKRRQRRRP	
Tat ARM	45-58	ISYGRK ^{ac} KRRQRRRP	^{ac} K50
Tat ARM	45-58	ISYGCKKRRQRRRP	R49C
Tat ARM	45-58	ISYGC ^{acm} KKRRQRRRP	R49 ^{acm} C
Tat ARM	45-58	ISYGCAARRQRRRP	R49C & KK50 51AA
Tat ARM	45-58	ISYGC ^{acm} AARRQRRRP	R49 ^{acm} C & KK50 51AA
Tat QRR	59-81	PQGSQTHQVLSKOPTSQSRGDP	
Tat C-Terminus	82-101	TGPKESKKKVERETETDPFD	
Tat Protein	1-72	MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNC YCKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKK RRQRRRPPQGSQTHQVLSKQ	
Histon H3	7-27	TARKSTGGKAPRKQLATKAAR	
Histon H4	3-20	GRGKGGKGLGKGGAKRHR	
HIV-1 Gag	6-20	SVLSGKKADELEKVR	
HIV-1 Gag	21-34	LRPGGKKKYMLKHV	
synthetisch +C		LHKSMGRTWQFDYNPEACVIK	
synthetisch -C		LHKSMGRTWQFDYNPEAVIK	

7.2 Verwendete Peptidgemische

Peptidgemisch	Peptidsequenz	Austausch	[M+H] ⁺	[^{ac} M+H] ⁺
S46X-1	LGIGYGRKKRR	S/G	1302.8	1344.8
	LGIA ^u YGRKKRR	S/A	1316.8	1358.8
	LGIS ^u YGRKKRR	wt	1332.8	1374.8
	LGIN ^u YGRKKRR	S/N	1359.8	1401.8
	LGIM ^u YGRKKRR	S/M	1376.8	1418.8
S46X-2	LGIPYGRKKRR	S/P	1342.9	1384.9
	LGIIYGRKKRR	S/I	1358.9	1400.9
	LGIKYGRKKRR	S/K	1373.9	1415.9
	LGIFYGRKKRR	S/F	1392.9	1434.9
	LGIWYGRKKRR	S/W	1431.9	1473.9
S46X-3	LGIVYGRKKRR	S/V	1344.9	1386.9
	LGICYGRKKRR	S/C	1348.8	1390.8
	LGIDYGRKKRR	S/D	1360.8	1402.8
	LGIEYGRKKRR	S/E	1374.8	1416.8
	LGIRYGRKKRR	S/R	1401.9	1443.9
S46X-4	LGITYGRKKRR	S/T	1346.8	1388.8
	LGILYGRKKRR	S/L	1358.9	1400.9
	LGIQYGRKKRR	S/Q	1373.9	1415.9
	LGIIHYGRKKRR	S/H	1382.9	1424.9
	LGIIYYGRKKRR	S/Y	1408.9	1450.9
G48X-1	ISYGRKKRR	wt	1162.7	1204.7
	ISYARKKRR	G/A	1176.7	1218.7
	ISYSRKKRR	G/S	1192.7	1234.7
	ISYNRKKRR	G/N	1219.8	1261.8
	ISYMRKKRR	G/M	1236.7	1278.7
G48X-2	ISYPRKKRR	G/P	1202.8	1244.8
	ISYIRKKRR	G/I	1218.8	1260.8
	ISYKRKKRR	G/K	1233.8	1275.8
	ISYFRKKRR	G/F	1252.8	1294.8
	ISYWRKKRR	G/W	1291.8	1333.8
G48X-3	ISYVRKKRR	G/V	1204.8	1246.8
	ISYCRKKRR	G/C	1208.7	1250.7
	ISYDRKKRR	G/D	1220.7	1262.7
	ISYERKKRR	G/E	1234.7	1276.7
	ISYRRKKRR	G/R	1261.8	1303.8
G48X-4	ISYTRKKRR	G/T	1206.8	1248.8
	ISYL ^u RKKRR	G/L	1218.8	1260.8
	ISYQRKKRR	G/Q	1233.8	1275.8
	ISYHRKKRR	G/H	1242.8	1284.8
	ISYYRKKRR	G/Y	1268.8	1310.8
R49X-1	ISYGGKKRR	R/G	1063.6	1105.6
	ISYGAKKRR	R/A	1077.6	1119.6
	ISYGSKKRR	R/S	1093.6	1135.6
	ISYGNKKRR	R/N	1120.6	1162.6
	ISYGMKKRR	R/M	1137.7	1179.7
R49X-2	ISYGPKKRR	R/P	1103.7	1145.7
	ISYGIKKRR	R/I	1119.7	1161.7
	ISYGKKKRR	R/K	1134.7	1176.7
	ISYGFKKRR	R/F	1153.7	1195.7
	ISYGWKKRR	R/W	1192.7	1234.7

R49X-3	ISYGVKKRR	R/V	1105.7	1147.7
	ISYGCKKRR	R/C	1109.6	1151.6
	ISYGDKKRR	R/D	1121.6	1163.6
	ISYGEKKRR	R/E	1135.7	1177.7
	ISYGRKKRR	wt	1162.7	1204.7
R49X-4	ISYGTKKRR	R/T	1107.7	1149.7
	ISYGLKKRR	R/L	1119.7	1161.7
	ISYGQKKRR	R/Q	1134.7	1176.7
	ISYGHKKRR	R/H	1143.7	1185.7
	ISYGYKKRR	R/Y	1169.7	1211.7
K51X-1	ISYGRKGRR	K/G	1091.6	1133.6
	ISYGRKARR	K/A	1105.6	1147.6
	ISYGRKSR	K/S	1121.6	1163.6
	ISYGRKNRR	K/N	1148.6	1190.6
	ISYGRKMRR	K/M	1165.6	1207.6
K51X-2	ISYGRKPRR	K/P	1131.7	1173.7
	ISYGRKIRR	K/I	1147.7	1189.7
	ISYGRKKRR	wt	1162.7	1204.7
	ISYGRKFRR	K/F	1181.7	1223.7
	ISYGRKWRR	K/W	1220.7	1262.7
K51X-3	ISYGRKVRR	K/V	1133.7	1175.7
	ISYGRKCRR	K/C	1137.6	1179.6
	ISYGRKDRR	K/D	1149.6	1191.6
	ISYGRKERR	K/E	1163.7	1205.7
	ISYGRKRRR	K/R	1190.7	1232.7
K51X-4	ISYGRKTRR	K/T	1135.7	1177.7
	ISYGRKLR	K/L	1147.7	1189.7
	ISYGRKQRR	K/Q	1162.7	1204.7
	ISYGRKHRR	K/H	1171.7	1213.7
	ISYGRKYRR	K/Y	1197.7	1239.7
R52X-1	ISYGRKKGR	R/G	1063.6	1105.6
	ISYGRKKAR	R/A	1077.6	1119.6
	ISYGRKKSR	R/S	1093.6	1135.6
	ISYGRKKNR	R/N	1120.6	1162.6
	ISYGRKKMR	R/M	1137.7	1179.7
R52X-2	ISYGRKKPR	R/P	1103.7	1145.7
	ISYGRKKIR	R/I	1119.7	1161.7
	ISYGRKKKR	R/K	1134.7	1176.7
	ISYGRKKFR	R/F	1153.7	1195.7
	ISYGRKKWR	R/W	1192.7	1234.7
R52X-3	ISYGRKKVR	R/V	1105.7	1147.7
	ISYGRKKCR	R/C	1109.6	1151.6
	ISYGRKKDR	R/D	1121.6	1163.6
	ISYGRKKER	R/E	1135.7	1177.7
	ISYGRKKRR	wt	1162.7	1204.7
R52X-4	ISYGRKKTR	R/T	1107.7	1149.7
	ISYGRKKLR	R/L	1119.7	1161.7
	ISYGRKKQR	R/Q	1134.7	1176.7
	ISYGRKKHR	R/H	1143.7	1185.7
	ISYGRKKYR	R/Y	1169.7	1211.7

7.3 Verwendete Oligonukleotid-Primer

Aminosäuresequenz Tat Wildtyp	A	L	G	I	S	Y	G	R	K	K	R	R	Q	
Wildtyp Primer (vorwärts)	gcc	tta	ggc	atc	tcc	tat	ggc	agg	aag	aag	cgg	aga	cag	c
Wildtyp Primer (rückwärts)	gct	gtc	tcc	gct	tct	tcc	tgc	cat	agg	aga	tgc	cta	agg	c
G48A Primer (vorwärts)	gcc	tta	ggc	atc	tcc	tat	<u>gca</u>	agg	aag	aag	cgg	aga	cag	c
G48A Primer (rückwärts)	gct	gtc	tcc	gct	tct	tcc	<u>tfg</u>	<u>cat</u>	agg	aga	tgc	cta	agg	c
G48D Primer (vorwärts)	gcc	tta	ggc	atc	tcc	tat	<u>gac</u>	agg	aag	aag	cgg	aga	cag	c
G48D Primer (rückwärts)	gct	gtc	tcc	gct	tct	tcc	<u>tgt</u>	<u>cat</u>	agg	aga	tgc	cta	agg	c
G48E Primer (vorwärts)	gcc	tta	ggc	atc	tcc	tat	<u>gag</u>	agg	aag	aag	cgg	aga	cag	c
G48E Primer (rückwärts)	gct	gtc	tcc	gct	tct	tcc	<u>tct</u>	<u>cat</u>	agg	aga	tgc	cta	agg	c

7.4 Substrate der Acetyltransferase p300

Accession Number	^{ac} K	Protein	Sequenz									
Q9Y6Q9	616	ACTR Coactivator [Chen et al., 1999]	P	L	E	S	K	G	H	K	K	
Q9Y6Q9	619	ACTR Coactivator [Chen et al., 1999]	S	K	G	H	K	K	L	L	Q	
Q9Y6Q9	620	ACTR Coactivator [Chen et al., 1999]	K	G	H	K	K	L	L	Q	L	
P10275	630	AR Androgen receptor [Fu et al., 2000]	L	G	A	R	K	L	K	K	L	
P10275	632	AR Androgen receptor [Fu et al., 2000]	A	R	K	L	K	K	L	G	N	
P10275	633	AR Androgen receptor [Fu et al., 2000]	R	K	L	K	K	L	G	N	L	
NP_008913	131	Cart1 [Iioka et al., 2003]	V	S	S	S	K	K	R	R	H	
1404381A	271	c-Jun [Vries et al., 2001]	S	K	C	R	K	R	K	L	E	
XP_004256	471	c-Myb Protooncogene product [Tomita et al., 2000]	Y	G	P	L	K	M	L	P	Q	
XP_004256	480	c-Myb Protooncogene product [Tomita et al., 2000]	A	Q	E	I	K	Y	G	P	L	
XP_004256	485	c-Myb Protooncogene product [Tomita et al., 2000]	P	T	P	F	K	H	A	L	A	
AAN06544	84	dTCF T-cell factor [Waltzer and Bienz, 1998]	V	K	I	F	K	D	E	G	D	
CAB40664	207	E1A adenovirus protein [Zhang and Bieker, 2000]	D	L	S	C	K	R	P	R	P	
CAB40664	239	E1A adenovirus protein [Zhang and Bieker, 2000]	L	C	P	I	K	P	V	A	V	
JC4929	117	E2F-1 [Marzio et al., 2000]	R	H	P	G	K	G	V	K	S	
JC4929	120	E2F-1 [Marzio et al., 2000]	G	K	G	V	K	S	P	G	E	
JC4929	125	E2F-1 [Marzio et al., 2000]	S	P	G	E	K	S	R	Y	E	
NP_004082	119	E2F-2 [Marzio et al., 2000]	L	P	S	P	K	T	P	K	S	
NP_004082	122	E2F-2 [Marzio et al., 2000]	P	K	T	P	K	S	P	G	E	
NP_004082	127	E2F-2 [Marzio et al., 2000]	S	P	G	E	K	T	R	Y	D	
NP_001940	168	E2F-3 [Marzio et al., 2000]	P	D	S	P	K	T	P	K	S	
NP_001940	171	E2F-3 [Marzio et al., 2000]	P	K	T	P	K	S	P	S	E	
NP_001940	176	E2F-3 [Marzio et al., 2000]	S	P	S	E	K	T	R	Y	D	
AAC51108	265	EKLF Erythroid Krueppel-like factor [Zhang et al., 1998]	T	A	P	S	K	R	G	R	R	
AAC51108	274	EKLF Erythroid Krueppel-like factor [Zhang et al., 1998]	S	W	A	R	K	R	Q	A	A	
AAC51108	288	EKLF Erythroid Krueppel-like factor [Zhang et al., 1998]	P	G	C	G	K	S	Y	T	K	
I38893	33	ER81 ET transcription factor [Goel and Janknecht, 2003]	V	R	K	R	K	F	I	N	R	
I38893	116	ER81 ET transcription factor [Goel and Janknecht, 2003]	S	Y	G	E	K	S	L	Y	N	
NP_000116	299	ER-alpha estrogen receptor [Wang et al., 2001]	P	L	M	I	K	R	S	K	K	
NP_000116	302	ER-alpha estrogen receptor [Wang et al., 2001]	I	K	R	S	K	K	N	S	L	
NP_000116	303	ER-alpha estrogen receptor [Wang et al., 2001]	K	R	S	K	K	N	S	L	A	

NP_004102	354	Fen-1 Flap endonuclease-1 [Hasan et al., 2001]	L	S	S	A	K	R	K	E	P
NP_004102	375	Fen-1 Flap endonuclease-1 [Hasan et al., 2001]	G	A	A	G	K	F	K	R	G
NP_004102	377	Fen-1 Flap endonuclease-1 [Hasan et al., 2001]	A	G	K	F	K	R	G	K	R
NP_004102	380	Fen-1 Flap endonuclease-1 [Hasan et al., 2001]	F	K	R	G	K	G	K	L	A
NP_002040	308	GATA-1 differentiation factor [Boyes et al., 1998]	T	R	N	R	K	A	S	G	K
NP_002040	312	GATA-1 differentiation factor [Boyes et al., 1998]	S	G	K	G	K	K	K	R	G
NP_002040	314	GATA-1 differentiation factor [Boyes et al., 1998]	K	A	S	G	K	G	K	K	K
P04908	6	H2A Histon [Sterner and Berger, 2000]	G	R	G	S	K	Q	G	G	K
P04908	14	H2A Histon [Sterner and Berger, 2000]	K	A	R	A	K	A	K	T	R
P04908	16	H2A Histon [Sterner and Berger, 2000]	R	A	K	A	K	T	R	S	S
NP_003520	15	H3 Histon [Sterner and Berger, 2000]	S	T	G	G	K	A	P	R	K
NP_003520	19	H3 Histon [Sterner and Berger, 2000]	K	A	P	R	K	Q	L	A	T
NP_003529	6	H4 Histon [Sterner and Berger, 2000]	S	G	R	G	K	G	G	K	G
NP_003529	9	H4 Histon [Sterner and Berger, 2000]	G	K	G	G	K	G	L	G	K
AAC68845	50	HIV-1 Tat [Ott et al., 1999]	I	S	Y	G	K	K	R	R	Q
S29857	12	HMG1 chromosomal protein [Bannister et al., 2000]	K	P	T	G	K	M	S	S	Y
NP_004956	3	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]			M	P	K	R	K	V	S
NP_004956	5	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	M	P	K	R	K	V	S	S	A
NP_004956	14	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	E	G	A	A	K	E	E	P	K
NP_004956	18	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	K	E	E	P	K	R	R	S	A
NP_004956	27	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	R	L	S	A	K	P	P	A	K
NP_004956	31	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	K	P	P	A	K	V	E	A	K
NP_004956	38	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	A	K	P	K	K	A	A	A	K
NP_004956	42	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	K	A	A	A	K	D	K	S	S
NP_004956	48	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	K	S	S	D	K	K	V	Q	T
NP_004956	53	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	K	V	Q	T	K	G	K	R	G
NP_004956	55	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	Q	T	K	G	K	R	G	A	K
NP_004956	59	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	K	R	G	A	K	G	K	Q	A
NP_004956	61	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	G	K	Q	A	K	Q	A	E	V
NP_004956	82	HMG14 chromosomal protein [Bergel et al., 2000]	N	G	E	T	K	T	E	E	S
NP_665906	65	HMGA1 chromosomal protein [Munshi et al., 2001]	P	K	G	S	K	N	K	G	A

AAH15803	75	IRF2 [Masumi et al., 2003]	K	P	D	P	K	T	W	K	A
P15172	99	MyoD myogenic protein [Polesskaya et al., 2000]	L	W	A	C	K	A	C	K	R
P15172	102	MyoD myogenic protein [Polesskaya et al., 2000]	C	K	A	C	K	R	K	T	T
P19838	431	p50 (NFxB) [Furia et al., 2002]	N	A	G	M	K	H	G	T	M
P19838	440	p50 (NFxB) [Furia et al., 2002]	D	T	E	S	K	K	D	P	E
P19838	441	p50 (NFxB) [Furia et al., 2002]	T	E	S	K	K	D	P	E	G
CAA42626	373	p53 tumor suppressor [Gu and Roeder,1997]	L	K	S	K	K	G	Q	S	T
CAA42626	382	p53 tumor suppressor [Gu and Roeder,1997]	S	R	H	K	K	L	M	F	K
P06400	873	pRB tumor suppressor [Chan et al., 2001]	P	K	P	L	K	K	L	R	F
P06400	874	pRB tumor suppressor [Chan et al., 2001]	K	P	L	K	K	L	R	F	D
NP_002257	22	Rch1 importin-alpha [Bannister et al., 2000]	K	N	K	G	K	D	S	T	E
AAA36408	218	RelA (NFxB) [Chen et al., 2003]	L	L	C	D	K	V	Q	K	E
AAA36408	221	RelA (NFxB) [Chen et al., 2003]	D	K	V	Q	K	E	D	I	E
AAA36408	310	RelA (NFxB) [Chen et al., 2003]	Y	E	T	F	K	S	I	M	K
AAA36630	481	Sp3 [Braun et al., 2001]	D	I	R	I	K	E	E	E	P
NP_002086	52	TFIIIEb transcription factor [Imhof et al., 1997]	S	S	G	S	K	Q	N	S	D

7.5 Natürliche Häufigkeiten von Aminosäuren

Aminosäure	Beobachtete Häufigkeit [%] in Vertebratenproteinen
S	8,1
L	7,6
G	7,4
A	7,4
K	7,2
V	6,8
T	6,2
D	5,9
E	5,8
P	5,0
N	4,4
R	4,2
F	4,0
I	3,8
Q	3,7
C	3,3
Y	3,3
H	2,9
M	1,8
W	1,3

(nach: King, J.L. and Jukes, T.H. (1969) Non-Darwinian evolution. Science 164, 788-98)

8 Literatur

Agalioti, T., Chen, G., Thanos, D. (2002) Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* 111, 381-92.

Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F.X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J.A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L.L., Ducommun, B., Trouche, D., Harel-Bellan, A. (1998) Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle- dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* 396, 184-6.

Akhtar, A., Zink, D., Becker, P.B. (2000) Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* 6802, 405-9.

Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L., Cote, J. (1999) NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J* 18, 5108-19.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., Mirsky, A.E. (1964) Acetylation and Methylation of Histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51:786-94.

Andres, H.H., Klem, A.J., Schopfer, L.M., Harrison, J.K., Weber, W.W. (1988) On the active site of liver acetyl-CoA. Arylamine N-acetyltransferase from rapid acetylator rabbits (III/J). *J Biol Chem* 263, 7521-7.

Annan, R.S. and Carr, S.A. (1996) Phosphopeptide analysis by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem* 68, 3413-21.

Arany, Z., Sellers, W.R., Livingston, D.M., Eckner, R. (1994) E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell* 77, 799-800.

Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 6610, 641-3.

Bannister, A.J. and Miska, E.A. (2000) Regulation of gene expression by transcription factor acetylation. *Cell Mol Life Sci* 57, 1184-92.

Bannister, A.J., Miska, E.A., Gorlich, D., Kouzarides, T. (2000) Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300 *Curr Biol* 10, 467-70.

Barlev, N.A., Poltoratsky, V., Owen-Hughes, T., Ying, C., Liu, L., Workman, J.L., Berger, S.L. (1998) Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain-mediated binding and phosphorylation by the Ku-DNA-dependent protein kinase complex. *Mol Cell Biol* 18, 1349-58.

- Barré-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 immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Bayer, P., Kraft, M., Ejchart, A., Westendorp, M., Frank, R., Rosch, P. (1995) Structural studies of HIV-1 Tat protein. *J Mol Biol* 247, 529-35.
- Benkirane, M., Chun, R.F., Xiao, H., Ogryzko, V.V., Howard, B.H., Nakatani, Y., Jeang, K.T. (1998) Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J Biol Chem* 273, 24898-905.
- Bergel, M., Herrera, J.E., Thatcher, B.J., Prymakowska-Bosak, M., Vassilev, A., Nakatani, Y., Martin, B., Bustin, M. (2000) Acetylation of novel sites in the nucleosomal binding domain of chromosomal protein HMG-14 by p300 alters its interaction with nucleosomes. *J Biol Chem* 275, 11514-20.
- Blanco, J.C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.J., Walker, Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y., Ozato, K. (1998) The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* 12, 1638-51.
- Bour, S., Schubert, U., Strebel, K. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J Virol* 69, 1510-20.
- Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., Ogryzko, V. (1998) Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 396, 594-8.
- Braun, H., Koop, R., Ertmer, A., Nacht, S., Suske, G. (2001) Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res* 29, 4994-5000.
- Bres, V., Tagami, H., Peloponese, J.M., Loret, E., Jeang, K.T., Nakatani, Y., Emiliani, S., Benkirane, M., Kiernan, R.E. (2002a) Differential acetylation of Tat coordinates its interaction with the co-activators cyclin T1 and PCAF. *EMBO J* 21, 6811-9.
- Bres, V., Kiernan, R., Emiliani, S., Benkirane, M. (2002b) Tat Acetyl-acceptor Lysines Are Important for Human Immunodeficiency Virus Type-1 Replication. *J Biol Chem* 277, 22215-21.
- Bres, V., Kiernan, R.E., Linares, L.K., Chable-Bessia, C., Plechakova, O., Treand, C., Emiliani, S., Peloponese, J.M., Jeang, K.T., Coux, O., Scheffner, M., Benkirane, M. (2003) A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter. *Nat Cell Biol* 5, 754-61.
- Brownell, J.E. and Allis, C.D. (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6, 176-84.

- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, Roth, S.Y., Allis, C.D. (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 6, 843-51.
- Browning, C.M., Smith, M.J., Clark, N.M., Lane, B.R., Parada, C. Montano, M., Kewal-Ramani, V.N., Littman, D.R., Essex, M., Roeder, R.G., Markovitz, D.M. (2001) Human GLI-2 is a Tat activation response element-independent Tat cofactor. *J Virol* 75, 2314-23.
- Bukrinsky, M.I., Haffar, O.K. (1997) HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front Biosci* 2, 578-87.
- Burley, S.K. and Roeder, R.G. (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 65, 769-99.
- Candau, R., Moore, P.A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C.Y., Rosen, C.A., Berger, S.L. (1996) Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol Cell Biol* 16, 593-602.
- Chakravarti, D., Ogryzko, V., Kao, H.Y., Nash, A., Chen, Nakatani, Y., Evans, R.M. (1999) A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell* 96, 393-403.
- Chan, H.M. and La Thangue, N.B. (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* 114, 2363-73.
- Chan, H.M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Demonacos, C., La Thangue, N.B. (2001) Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol* 3, 667-74.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., Evans, R.M. (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-80.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D., Evans, R.M. (1999) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98, 675-86.
- Chen, L.F., Mu, Y., Greene, W.C. (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J* 21, 6539-48.
- Cheung, P., Allis, C.D., Sassone-Corsi, P. (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-71.
- Chiang, C.M. and Roeder, R.G. (1995) Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267, 531-6.

- Chiu, Y.L., Coronel, E., Ho, C.K., Shuman, S., Rana, T.M. (2001) HIV-1 Tat protein interacts with mammalian capping enzyme and stimulates capping of TAR RNA. *J Biol Chem* 276, 12959-66.
- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V. Lees, E., Nakatani, Y., Reinberg, D. (1998) A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol* 18, 5355-63.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., Goodman, R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-9.
- Clements, A., Rojas, J.R., Trievel, R.C., Wang, L., Berger, S.L., Marmorstein, R. (1999) Crystal structure of the histone acetyltransferase domain of the human PCAF transcriptional regulator bound to coenzyme A. *EMBO J* 18, 3521-32.
- Cohen, E.A., Subbramanian, R.A., Gottlinger, H.G. (1996) Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 214, 219-35.
- Col, E., Caron, C., Seigneurin-Berny, D., Gracia, J., Favier, A., Khochbin, S. (2001) The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat. *J Biol Chem* 276, 28179-84.
- Col, E., Gilquin, B., Caron, C., Khochbin, S. (2002) Tat-controlled protein acetylation. *J Biol Chem* 277, 37955-60.
- Copeland, K. F. and Heeney, J. L. (1996). T helper cell activation and human retroviral pathogenesis. *Microbiol Rev* 60, 722-42.
- Creighton, T.E. (1983) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, Freeman, New York.
- Crews, S.T. and Fan, C.M. (1999) Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr Opin Genet Dev* 9, 580-7.
- Cujec, T.P., Okamoto, H., Fujinaga, K., Meyer, J., Chamberlin, H. et al. (1997) The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* 11, 2645-57.
- Cullen, B. R. (1998) HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93, 685-92.
- Dahmus, M.E. (1995) Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta* 1261,171-82.
- Dalgleish, A.G., Beverly, P.C.L., Clapman, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., Weiss, R.A. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of receptor for AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763-767.

- De Falco, G., Bellan, C., Lazzi, S., Claudio, P., La Sala, D. Cinti, C., Tosi, P., Giordano, A., Leoncini, L. (2003) Interaction between HIV-1 Tat and pRb2/p130: a possible mechanism in the pathogenesis of AIDS-related neoplasms. *Oncogene* 22, 6214-9.
- Demarchi, F., d'Adda di Magagna, F., Falaschi, A., Giacca, M. (1996) Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70,4427-37.
- 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, 661-6.
- Deng, L., de la Fuente, C., Fu, P., Wang, L., Donnelly, Wade, J.D., Lambert, P., Li, H., Lee, C.G., Kashanchi, F. (2000) Acetylation of HIV-1 tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology* 277, 278-95.
- Deng, L., Wang, D., de la Fuente, C., Wang, L., Li, H. Lee, C.G., Donnelly, R., Wade, J.D., Lambert, P., Kashanchi, F. (2001) Enhancement of the p300 HAT activity by HIV-1 Tat on chromatin DNA. *Virology* 289, 312-26.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., Zhou, M. M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491-6.
- Dormeyer, W., Dorr, A., Ott, M., Schnolzer, M. (2003) Acetylation of the HIV-1 Tat protein: an in vitro study. *Anal Bioanal Chem.* 376, 994-1005.
- Dorr, A., Kiermer, V., Pedal, A., Rackwitz, H. R., Henklein, P., Schubert, U., Zhou, M.M., Verdin, E., Ott, M. (2002) Transcriptional synergy between Tat and PCAF is dependent on the binding of acetylated Tat to the PCAF bromodomain. *Embo J* 21, 2715-23.
- Dunphy, E.L., Johnson, T., Auerbach, S.S., Wang, E.H. (2000) Requirement for TAF(II)250 acetyltransferase activity in cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 20, 1134-9.
- Dutnall, R.N., Tafrov, S.T., Sternglanz, R., Ramakrishnan, V. (1998) Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily. *Cell* 94, 427-38.
- Eckner, R. (1996) p300 and CBP as transcriptional regulators and targets of oncogenic events. *Biol Chem* 377, 685-8.
- Eckner, R., Ewen, M.E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J.A., Lawrence, J.B., Livingston, D.M. (1994) Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* 8, 869-84.

- Esser, M.T., Graham, D.R., Coren, L.V., Trubey, C.M., Bess, J.W. Jr., Arthur, L.O., Ott, D.E., Lifson, J.D. (2001) Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation. *J Virol* 75, 6173-82.
- Fauci, A.S. (1988) The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239, 617-22.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 263, 872-7.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., Gallant, J., Markowitz, M., Ho, D.D., Richman, D.D., Siliciano, R.F. (1997) Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278, 1295-300.
- Franke, E.K., Yuan, H.E., Luban, J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372, 359-62.
- Frankel, A.D. and Young, J.A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67, 1-25.
- Fridell, R.A., Harding, L.S., Bogerd, H.P., Cullen, B.R. (1995) Identification of a novel human zinc finger protein that specifically interacts with the activation domain of lentiviral Tat proteins. *Virology* 209, 347-57.
- Fu, M., Wang, C., Reutens, A.T., Wang, J., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Ogryzko, V., Avantaggiati, M.L., Pestell, R.G. (2000) p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem* 275, 20853-60.
- Furia, B., Deng, L., Wu, K., Baylor, S., Kehn, K., Li, H., Donnelly, R., Coleman, T., Kashanchi, F. (2002) Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins. *J Biol Chem* 277, 4973-80.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D., Trono, D. (1997) HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9825-30.
- 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. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLVIII) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500-3.
- Garber, M.E. and Jones, K.A. (1999) HIV-1 Tat: coping with negative elongation factors. *Curr Opin Immunol* 11, 460-5.

- Garcia, J.A., Harrich, D., Pearson, L., Mitsuyasu, R., Gaynor, R.B. (1988) Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J* 10, 3143-7.
- Giles, R.H., Peters, D.J., Breuning, M.H. (1998) Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet* 14, 178-83.
- Giordano, A. and Avantaggiati, M.L. (1999) p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol* 181, 218-30.
- Goel, A. and Janknecht, R. (2003) Acetylation-mediated transcriptional activation of the ETS protein ER81 by p300, P/CAF, and HER2/Neu. *Mol Cell Biol* 23, 6243-54.
- Grant, G.A., Crankshaw, M.W., Gorka, J. (1997) Edman sequencing as tool for characterization of synthetic peptides. *Methods Enzymol* 289, 395-419.
- Grant, P.A. and Berger, S.L. (1999) Histone acetyltransferase complexes. *Cell Dev Biol* 10, 169-77.
- Greene, W.C. and Peterlin, B.M. (2002) Charting HIV's remarkable voyage through the cell. *Nat Med* 8, 673-80.
- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
- Hampsey, M. (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 465-503.
- Hansen, J.C., Tse, C., Wolffe, A.P. (1998) Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 51, 17637-41.
- Hasan, S., Stucki, M., Hassa, P.O., Imhof, R., Gehrig, P., Hunziker, P., Hubscher, U., Hottiger, M.O. (2001) Regulation of human flap endonuclease-1 activity by acetylation through the transcriptional coactivator p300. *Mol Cell* 7, 1221-31.
- Hauber, J., Perkins, A., Heimer, E.P., Cullen, B.R. (1987) Trans-activation of human immunodeficiency virus gene expression is mediated by nuclear events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6364-8.
- Hauber, J., Malim, M.H., Cullen, B.R. (1989) Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* 63, 1181-7.
- Haynes, S.R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., Dawid, I.B. (1992) The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 20, 2603.

- Hazenberg, M.D., Hamann, D., Schuitemaker, H., Miedema, F. (2000) T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat Immunol* 1, 285-9.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J* 7, 1395-402.
- Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M., Emerman, M. (1994) The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7311-5.
- Henriksson, P., Pfeiffer, T., Zentgraf, H., Alke, A., Bosch, V. (1999) Incorporation of wild-type and C-terminally truncated human epidermal growth factor receptor into human immunodeficiency virus-like particles: insight into the processes governing glycoprotein incorporation into retroviral particles. : *J Virol* 73, 9294-302.
- Herrmann, C.H. and Rice, A.P. (1995) Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxylterminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J Virol* 69, 1612-20.
- Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Dreyer, W.J., *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 7990-7.
- Ho, D.D., Neuman, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M. (1995) Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123-126.
- Holloway, A.F., Occhiodoro, F., Mittler, G., Meisterernst, M., Shannon, M.F. (2000) Functional interaction between the HIV transactivator Tat and the transcriptional coactivator PC4 in T cells. *J Biol Chem* 275, 21668-77.
- Hottiger, M.O. and Nabel, G.J. (1998) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat with the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *J Virol* 72, 8252-6.
- Howcroft, T.K., Strebel, K., Martin, M.A., Singer, D.S. (1993) Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science* 260, 1320-2.
- Hsieh, Y.J., Kundu, T.K., Wang, Z., Kovelman, R., Roeder, R.G. (1999) The TFIIC90 subunit of TFIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol* 19, 7697-704.
- Iioka, T., Furukawa, K., Yamaguchi, A., Shindo, H., Yamashita, S., Tsukazaki, T. (2003) P300/CBP acts as a coactivator to cartilage homeoprotein-1 (Cart1), paired-like homeoprotein, through acetylation of the conserved lysine residue adjacent to the homeodomain. *J Bone Miner Res* 18, 1419-29.

- Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P., Ge, H. (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases, *Curr Biol* 7, 689-92.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., Tjian, R. (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288, 1422-5.
- Janknecht, R. and Hunter, T. (1996) Transcription. A growing coactivator network. *Nature* 383, 22-3.
- Jeang, K.T., Chun, R., Lin, N.H., Gagnol, A., Glabe, C.G., Fan, H. (1993) In vitro and in vivo binding of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and Sp1 transcription factor. *J Virol* 67, 6224-33.
- Jeanmougin, F., Wurtz, J.M., Le Douarin, B., Chambon, P., Losson, R. (1997) The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* 22, 151-3.
- John, S., Howe, L., Tafrov, S.T., Grant, P.A., Sternglanz, R., Workman, J.L. (2000) The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. *Genes Dev* 14, 1196-208.
- Jones, K.A., Luciw, P.A., Duchange, N. (1988) Structural arrangements of transcription control domains within the 5'-untranslated leader regions of the HIV-1 and HIV-2 promoters. *Genes Dev* 2, 1101-14.
- Jones, K.A., Luciw, P.A., Duchange, N. (1988) Structural arrangements of transcription control domains within the 5'-untranslated leader regions of the HIV-1 and HIV-2 promoters. *Genes Dev* 2, 1101-14.
- Jones, K.A. and Peterlin, B.M. (1994) Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* 63,717-43.
- Kaehlcke, K., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kiermer, V., Henklein, P., Schnoelzer, M., Loret, E., Cole, P.A., Verdin, E., Ott, M. (2003) Acetylation of Tat defines a cyclinT1-independent step in HIV transactivation. *Mol Cell* 12, 167-76.
- Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., Chinnadurai, G. (1996) Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* 216, 357-66.
- Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T.P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D.M., Yokoyama, K.K. (1998) Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* 393, 284-9.
- Kee, B.L., Arias, J., Montminy, M.R. (1996) Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* 271, 2373-5.

- Keen, N.J., Churcher, M.J., Karn, J. (1997) Transfer of Tat and release of TAR RNA during the activation of the human immunodeficiency virus type-1 transcription elongation complex. *EMBO J* 16, 5260-72.
- Kiernan, R.E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K.T., Benkirane, M., Van Lint, C. (1999) HIV-1 Tat transcriptional activity is regulated by acetylation, *EMBO J* 18, 6106-6118.
- Kim, J.Y., Kim, K.W., Kwon, H.J., Lee, D.W., Yoo, J.S. (2002) Probing lysine acetylation with a modification-specific marker ion using high-performance liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry with collision-induced dissociation. *Anal Chem* 74, 5443-9.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1998) Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, 703-7.
- Kouzarides, T. (1999) Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 9, 40-8.
- Kouzarides, T. (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* 19, 1176-9.
- Kratzer, R., Eckerskorn, C., Karas, M., Lottspeich, F. (1998) Suppression effects in enzymatic peptide ladder sequencing using ultraviolet - matrix assisted laser desorption/ionization - mass spectrometry. *Electrophoresis*, 19, 1910-19.
- Krumm, A., Madisen, L., Yang, X.J., Goodman, R., Nakatani, Y., Groudine, M. (1998) Long-distance transcriptional enhancement by the histone acetyltransferase PCAF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13501-6.
- Kumar, B.R., Swaminathan, V., Banerjee, S., Kundu, T.K. (2001) p300-mediated acetylation of human transcriptional coactivator PC4 is inhibited by phosphorylation. *J Biol Chem* 276, 16804-9
- Kundu, T.K., Wang, Z., Roeder, R.G. (1999) Human TFIIC relieves chromatin-mediated repression of RNA polymerase III transcription and contains an intrinsic histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol* 19, 1605-15.
- Kuo, M.H. and Allis, C.D. (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20, 615-26.
- Kuppuswamy, M., Subramanian, T., Srinivasan, A., Chinnadurai G. (1989) Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* 17, 3551-61.
- Kuster, B. and Mann, M. (1998) Identifying proteins and post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Struct Biol* 8, 393-400.

- Lapko, V.N., Smith, D.L., Smith, J.B. (2001) In vivo carbamylation and acetylation of water-soluble human lens alphaB-crystallin lysine 92. *Protein Sci* 10, 1130-6.
- Lau, O.D., Kundu, T.K., Soccio, R.E., Ait-Si-Ali, S., Khalil, E.M., Vassilev, A., Wolffe, A.P., Nakatani, Y., Roeder, R.G., Cole, P.A. (2000a) HATs off: selective synthetic inhibitors of the histone acetyltransferases p300 and PCAF. *Mol Cell* 5, 589-95.
- Lau, O.D., Courtney, A.D., Vassilev, A., Marzilli, L.A., Cotter, R.J., Nakatani, Y., Cole, P.A. (2000b) p300/CBP-associated factor histone acetyltransferase processing of a peptide substrate. Kinetic analysis of the catalytic mechanism. *J Biol Chem* 275, 21953-9.
- Lee, S.W., Berger, S.J., Martinovic, S., Pasa-Tolic, L., et al., (2002) Direct mass spectrometric analysis of intact proteins of the yeast large ribosomal subunit using capillary LC/FTICR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 5942-7.
- Li, H., Gomes, P.J., Chen, J.D. (1997) RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8479-84.
- Liu, J., Perkins, N.D., Schmid, R.M., Nabel, G.J. (1992) Specific NF-kappa B subunits act in concert with Tat to stimulate human immunodeficiency virus type 1 transcription. *J Virol* 66, 3883-7.
- Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D., Berger, S.L. (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202-9.
- Liu, Y., Li, J., Kim, B.O., Pace, B.S., He, J.J. (2002) HIV-1 Tat protein-mediated transactivation of the HIV-1 long terminal repeat promoter is potentiated by a novel nuclear Tat-interacting protein of 110 kDa, Tip110. *J Biol Chem* 277, 23854-63.
- Long, K.S. and Crothers, D.M. (1995) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat-derived peptides with TAR RNA. *Biochemistry* 27, 8885-95.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D.F., Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature* 389, 251-60.
- Lundblad, J.R., Kwok, R.P., Laurance, M.E., Harter, M.L., Goodman, R.H. (1995) Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 374, 85-8.
- Mangasarian, A. and Trono, D. (1997) The multifaceted role of HIV Nef. *Res Virol* 148, 30-3.
- Manning, E.T., Ikehara, T., Ito, T., Kadonaga, J.T., Kraus, W.L. (2001) p300 forms a stable, template-committed complex with chromatin: role for the bromodomain. *Mol Cell Biol* 21, 3876-87.

- Margolick, J. B., Volkman, D. J., Folks, T. M., Fauci, A. S. (1987) Amplification of HTLV-III/LAV infection by antigen-induced activation of T-cells and direct suppression by virus of lymphocyte blastogenic responses. *J Immunol* 138, 1719-23.
- Marmorstein, R. (2001) Structure of histone acetyltransferases. *J Mol Biol* 311, 433-44.
- Martinez-Balbas, M.A., Bannister, A.J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., Kouzarides, T. (1998) The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J* 15;17, 2886-93.
- Marzio, G., Tyagi, M., Gutierrez, M. I., Giacca, M. (1998) HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13519-24.
- Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M.I., Cartwright, P., Helin, K., Giacca, M. (2000) E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* 275, 10887-92.
- Masumi, A., Yamakawa, Y., Fukazawa, H., Ozato, K., Komuro, K. (2003) Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation. *J Biol Chem* 278, 25401-7.
- McMichael, A. J. and Phillips, R. E. (1997) Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annu Rev Immunol* 15, 271-96.
- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., Nakatani, Y., Allis, C.D. (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-70.
- Modis, Y. and Wierenga, R. (1998) Two crystal structures of N-acetyltransferases reveal a new fold for CoA-dependent enzymes. *Structure* 6, 1345-50.
- Modis, Y. and Wierenga, R.K. (1999) A biosynthetic thiolase in complex with a reaction intermediate: the crystal structure provides new insights into the catalytic mechanism. *Structure Fold Des*, 7, 1279-90.
- Moran, E. (1993) Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53. *FASEB J* 7, 880-5.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J.E., Ott, M., Verdin, E., Zhou, M.M. (2002) Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol Cell* 9, 575-86.
- Munshi, N., Agaloti, T., Lomvardas, S., Merika, M., Chen, G., Thanos, D. (2001) Coordination of a transcriptional switch by HMG(I)Y acetylation. *Science* 293, 1133-36.
- Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G., Thanos, D. (1998) Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell* 2, 457-67.

- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S.F., Lee, C.G., Hurwitz, J., Parvin, J.D., Montminy, M. (1997) RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* 90, 1107-12.
- Nelbock, P., Dillon, P.J., Perkins, A., Rosen, C.A. (1990) A cDNA for a protein that interacts with the human immunodeficiency virus Tat transactivator. *Science* 248, 1650-3.
- Neuwald, A.F. and Landsman, D. (1997) GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem Sci* 22, 154-5.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B.H., Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases, *Cell* 87, 953-9.
- Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R.L., Howard, T., Yang, X.J., Howard, B.H., Qin, J., Nakatani, Y. (1998) Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94, 35-44.
- Ott, M., Emiliani, S., Van Lint, C., Herbein, G., Lovett, J., Chirmule, N., McCloskey, T., Pahwa, S., Verdin, E. (1997) Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science* 275, 1481-5.
- Ott, M., Schnolzer, M., Garnica, J., Fischle, W., Emiliani, Rackwitz, H.R., Verdin, E. (1999) Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr Biol* 9, 1489-92.
- Pandey, R., Muller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W., Jorgensen, R.A. (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 30, 5036-55.
- Pantaleo, G. and Fauci, A. S. (1995) Apoptosis in HIV infection. *Nat Med* 1, 118-20.
- Peloponese, J.M. Jr., Gregoire, C., Opi, S., Esquieu, D., Sturgis, J. Lebrun, E., Meurs, E., Collette, Y., Olive, D., Aubertin, A.M, Witvrow, M., Pannecouque, C., De Clercq, E., Bailly, C., Lebreton, J., Loret, E.P. (2000) 1H-13C nuclear magnetic resonance assignment and structural characterization of HIV-1 Tat protein. *C R Acad Sci III* 323, 883-94.
- Pemberton, I.K., Buc, H., Buckle, M. (1998) Displacement of viral DNA termini from stable HIV-1 integrase nucleoprotein complexes induced by secondary DNA-binding interactions. *Biochemistry* 37, 2682-90.
- Peterlin, M.B. and Trono, D. (2003) Hide, shield and strike back: How HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3, 97-107.
- Pogo, B.G., Allfrey, V.G., Mirsky, A.E. (1966) RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55, 805-12.

- Polesskaya, A., Duquet, A., Naguibneva, I., Weise, C., Vervisch, A. (2000) CREB-binding protein/p300 activates MyoD by acetylation. *J Biol Chem* 275, 34359-64.
- Polevoda, B. and Sherman, F. (2002) The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol* 5, reviews0006.
- Quesnel, S. and Silvius, J.R. (1994) Cysteine-containing peptide sequences exhibit facile uncatalyzed transacylation and acyl-CoA-dependent acylation at the lipid bilayer interface. *Biochemistry* 33, 13340-48.
- Richter, S., Cao, H., Rana, T.M. (2002) Specific HIV-1 TAR RNA loop sequence and functional groups are required for human cyclin T1-Tat-TAR ternary complex formation. *Biochemistry* 41, 6391-97.
- Rohr, O., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Marban, C., Avram, D., Aunis, D., Leid, M., Schaeffer, E. (2003) Recruitment of Tat to heterochromatin protein HP1 via interaction with CTIP2 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in microglial cells. *J Virol* 77, 5415-27.
- Roth, S.Y., Shimizu, M., Johnson, L., Grunstein, M., Simpson, R.T. (1992) Stable nucleosome positioning and complete repression by the yeast alpha 2 repressor are disrupted by amino-terminal mutations in histone H4. *Genes Dev* 6, 411-25.
- Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W.A., Rosen, C.A. (1989) Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* 63, 1-8.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W., Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, 12, 2831-41.
- Santos-Rosa, H., Valls, E., Kouzarides, T., Martinez-Balbas, M. (2003) Mechanisms of P/CAF auto-acetylation. *Nucleic Acids Res* 31, 4285-92.
- Scarlatti, G., Tresoldi, E., Björndal, Å., Fredriksson, R., Colognesi, C., Deng, H.K., Malnati, M.S., Plebani, A., Siccardi, A.G., Littman, D.R., Fenyö, E.M., Lusso, P. (1997) In vivo evolution of HIV-1 coreceptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression, *Nature Med* 3, 1259-1265.
- Schiltz, R.L., Mizzen, C.A., Vassilev, A., Cook, R.G., Allis, C.D., Nakatani, Y. (1999) Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem* 274, 1189-92.
- Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., Bushman, F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521-9.
- Schultz, A.M., Henderson, L.E., Oroszlan, S. (1988) Fatty acylation of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 4, 611-47.

- Scolnick, D.M., Chehab, N.H., Stavridi, E.S., Lien, M.C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S.L., Halazonetis, T.D. (1997) CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 57, 3693-6.
- Seigel, L.J., Ratner, L., Josephs, S.F., Derse, D., Feinberg, M.B., Reyes, G.R., O'Brien, S.J., Wong-Staal, F. (1986) Transactivation induced by human T-lymphotropic virus type III (HTLV III) maps to a viral sequence encoding 58 amino acids and lacks tissue specificity. *Virology* 148, 226-31.
- Sheridan, P.L., Mayall, T.P., Verdin, E., Jones, K.A. (1997) Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro. *Genes Dev* 11, 3327-40.
- Sherman, M.P., de Noronha, C.M., Heusch, M.I., Greene, S., Greene, W.C. (2001) Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 75, 1522-32.
- Sickmann, A., Mreyen, M., Meyer, H.E. (2002) Identification of modified proteins by mass spectrometry. *IUBMB Life* 54, 51-7.
- Siomi, H., Shida, H., Nam, S.H., Nosaka, T., Maki, M., Hatanaka, M. (1988) Sequence requirements for nucleolar localization of human T cell leukemia virus type I pX protein, which regulates viral RNA processing. *Cell* 55, 197-209.
- Siomi, H., Shida, H., Maki, M., Hatanaka, M. (1990) Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J Virol* 64, 1803-07.
- Song, C.Z., Keller, K., Chen, Y., Stamatoyannopoulos, G. (2003) Functional interplay between CBP and PCAF in acetylation and regulation of transcription factor KLF13 activity. *J Mol Biol* 329, 207-15.
- Starai, V.J., Celic, I., Cole, R.N., Boeke, J.D., Escalante-Semerena, J.C. (2002) Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science* 298, 2390-2.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 435-59.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-5.
- Tajul-Arifin, K., Teasdale, R., Ravasi, T., Hume, D.A., Mattick, J.S.; RIKEN GER Group; GSL Members (2003) Identification and analysis of chromodomain-containing proteins encoded in the mouse transcriptome. *Genome Res* 13, 1416-29.
- Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, A.M., Kaufman, T.C., Kennison, J.A. (1992) brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 3, 561-72.

- Tanner, K.G., Trievel, R.C., Kuo, M.H., Howard, R.M., Berger, S.L., Allis, C.D., Marmorstein, R., Denu, J.M. (1999) Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J Biol Chem* 274, 18157-60.
- Taylor, B.L. and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 479-506.
- Thompson, P.R., Kurooka, H., Nakatani, Y., Cole, P.A. (2001) Transcriptional coactivator protein p300. Kinetic characterization of its histone acetyltransferase activity. *J Biol Chem* 276, 33721-9.
- Tomita, A., Towatari, M., Tsuzuki, S., Hayakawa, F., Kosugi, H., Tamai, K., Miyazaki, T., Kinoshita, T., Saito, H. (2000) c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene* 19, 444-51.
- Tsukiyama, T. and Wu, C. (1997) Chromatin remodeling and transcription. *Curr Opin Genet Dev* 7, 182-91.
- Ugrinova, I., Pasceva, E.A., Armengaud, J., Pashev, I.G. (2001) In vivo acetylation of HMG1 protein enhances its binding affinity to distorted DNA structures. *Biochemistry* 40, 14655-60.
- Upton, A., Johnson, N., Sandy, J., Sim, E. (2001) Arylamine N-acetyltransferases - of mice, men and microorganisms. *Trends Pharmacol Sci* 22, 140-46.
- Van Lint, C., Emiliani, S., Ott, M., Verdin, E. (1996) Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *Embo J* 15, 1112-20.
- Vendel, A.C. and Lumb, K.J. (2003) Molecular recognition of the human coactivator CBP by the HIV-1 transcriptional activator Tat. *Biochemistry* 42, 910-6.
- Verdin, E., Paras, P. Jr., Van Lint, C. (1993) Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *Embo J* 12, 3249-59.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* 15, 3667-75.
- Vries, R.G., Prudenziati, M., Zwartjes, C., Verlaan, M., Kalkhoven, E., Zantema, A. (2001) A specific lysine in c-Jun is required for transcriptional repression by E1A and is acetylated by p300. *EMBO J* 20, 6095-103.
- Waltzer, L. and Bienz, M. (1998) Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature* 395, 521-5.

- Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A.T., Albanese, C., Lisanti, M.P., Katzenellenbogen, B.S., Kato, S., Hopp, T., Fuqua, S.A., Lopez, G.N., Kushner, P.J., Pestell, R.G. (2001) Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 276, 8375-83.
- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., Humphrey-Smith, I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090-4.
- Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H., Jones, K. A. (1998) A novel CDK9-associated Ctype cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92, 451-62.
- Weissman, J.D., Brown, J.A., Howcroft, T.K., Hwang, J., Chawla, A., Chawla, A., Roche, P.A., Schiltz, L., Nakatani, Y., Singer, D.S. (1998) HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11601-6.
- Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, Walczak, H., Debatin, K.M., Krammer, P.H. (1995) Sensitization of T-cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375, 497-500.
- Westendorp, M.O., Li-Weber, M., Frank, R.W., Krammer, P.H. (1994) Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells. *J Virol* 68, 4177-85.
- Whyte, P., Williamson, N.M., Harlow, E. (1989) Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* 56, 67-75.
- Winston, F. and Allis, C.D. (1999) The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Biol* 6, 601-4.
- Wolffe, A.P. and Haye, J.J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 27, 711-20.
- Xiao, H., Neuveut, C., Benkirane, M., Jeang, K.T. (1998a) Interaction of the second coding exon of Tat with human EF-1 delta delineates a mechanism for HIV-1-mediated shut-off of host mRNA translation. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 384-9.
- Xiao, H., Tao, Y., Greenblatt, J., Roeder, R.G. (1998b) A cofactor, TIP30, specifically enhances HIV-1 Tat-activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2146-51.
- Yaciuk, P and Moran, E. (1991) Analysis with specific polyclonal antiserum indicates that the E1A-associated 300-kDa product is a stable nuclear phosphoprotein that undergoes cell cycle phase-specific modification. *Mol Cell Biol* 11, 5389-97.

- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., Handa, H. (1999) NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* 97, 41-51.
- Yamauchi, T., Yamauchi, J., Kuwata, T., Tamura, T., Yamashita, T., Bae, N., Westphal, H., Ozato, K., Nakatani, Y. (2000) Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAFB/GCN5 in mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11303-6.
- Yan, Y., Barlev, N.A., Haley, R.H., Berger, S.L., Marmorstein, R. (2000) Crystal structure of yeast Esa1 suggests a unified mechanism for catalysis and substrate binding by histone acetyltransferases. *Mol Cell* 6, 1195-205.
- Yan, Y., Harper, S., Speicher, D.W., Marmorstein R. (2002) The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate. *Nat Struct Biol* 9, 862-9.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A, *Nature* 382, 319-24.
- Yang, X., Gold, M.O., Tang, D.N., Lewis, D.E., Aguilar-Cordova, E. Rice, A.P., Herrmann, C.H. (1997) TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12331-6.
- Yao, T.P., Oh, S.P., Fuchs, M., Zhou, N.D., Ch'ng, L.E., et al (1998) Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93, 361-72.
- Yu, L., Zhang, Z., Loewenstein, P.M., Desai, K., Tang, Q. Mao, D., Symington, J.S., Green, M. (1995) Molecular cloning and characterization of a cellular protein that interacts with the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator and encodes a strong transcriptional activation domain. *J Virol* 69, 3007-16.
- Yuan, L.W., Soh, J.W., Weinstein, I.B. (2002) Inhibition of histone acetyltransferase function of p300 by PKCdelta. *Biochim Biophys Acta* 1592, 205-11.
- Yuan, W., Condorelli, G., Caruso, M., Felsani, A., Giordano, A. (1996) Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD. *J Biol Chem* 271, 9009-13.
- Zhang, K., Williams, K.E., Huang, L., Yau, P., Siino, J.S., Bradbury, E.M., Jones, P.R., Minch, M.J., Burlingame, A.L. (2002) Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 1, 500-8.
- Zhang, K. and Tang, H. (2003) Analysis of core histones by liquid chromatography-mass spectrometry and peptide mapping. *J Chromatogr B* 783, 173-9.

Zhang, Q., Yao, H., Vo, N., Goodman, R.H. (2000) Acetylation of adenovirus E1A regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14323-8.

Zhang, W. and Bieker, J.J. (1998) Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9855-60.

Zhou, M., Halanski, M.A., Radonovich, M. F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D.H., Brady, J.N. (2000) Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol* 20, 5077-86.

Zhou, Q. and Sharp, P.A. (1996) Tat-SF1: cofactor for stimulation of transcriptional elongation by HIV-1 Tat. *Science* 274, 605-10.

Zhou, Q., Chen, D., Pierstorff, E., Luo, K. (1998) Transcription elongation factor P-TEFb mediates Tat activation of HIV-1 transcription at multiple stages. *EMBO J* 13, 3681-91.

9 Lebenslauf

Wilma Dormeyer, Dipl. Biochem.

Geburtstag: 10. Januar 1975

Bergheimer Str. 87a

69115 Heidelberg

Deutschland

Tel.: ++49-6221-656069

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Zentrale Proteinanalytik B100

Im Neuenheimer Feld 580

69120 Heidelberg

Deutschland

Tel.: ++49-6221-42-4548

Fax.: ++49-6221-42-4562

w.dormeyer@dkfz.de

Ausbildung

November 2000 – Gegenwart

Doktorarbeit (Ph.D.)

“Die biochemische Analyse der Proteinacetylierung
am Beispiel des HIV-1 Tat Proteins”

1. Betreuerin: Dr. Martina Schnölzer

Zentrale Proteinanalytik

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, Deutschland

2. Betreuerin: Melanie Ott, MD, PhD

Gladstone Institute of Virology and Immunology

University of California, San Francisco, CA

November 1999 – August 2000

Diplomarbeit (Dipl. Biochem.)

“Charakterisierung und Variabilität der Proteinzusammensetzung
des humanen Liquors mittels Proteomanalyse“

Betreuer: Prof. Dr. Helmut E. Meyer

Institut für Physiologische Chemie / Medizinische Fakultät

Ruhr-Universität Bochum, Deutschland

November 1997 - Oktober 1999

Hauptstudium Biochemie

Ruhr-Universität Bochum, Deutschland

April 1997 – Oktober 1997

Auslandspraktikum

Instrumentelle und Mikrobiologische Qualitätskontrolle

Bayer de Venezuela, Caracas, Venezuela

Oktober 1994 – März 1997

Grundstudium Biochemie

Ruhr-Universität Bochum, Deutschland

Juli 1994

Abitur

Jacobson Gymnasium Seesen, Germany