

**Untersuchungen zur Konformation und Dynamik
der Reversen Transkriptase von HIV-1
durch ESR- und Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Chemie
der Universität Dortmund**

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

**vorgelegt von
Oliver Kensch
aus Unna**

Dortmund, August 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1996 bis Juni 2000 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter Anleitung von Prof. Dr. Roger S. Goody in der Abteilung Physikalische Biochemie angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. R.S. Goody
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Lippert

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Retroviren	1
1.2 Aufbau von Retroviren	1
1.3 Der Replikationszyklus von HIV	2
1.4 Reverse Transkription	3
1.5 Struktur der RT von HIV-1	5
1.6 Substratbindung und Nukleotideinbau durch HIV-1 RT	8
1.7 Strukturuntersuchungen	10
1.8 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)	11
1.9 Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie	12
1.10 Ziele der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Molekularbiologische Methoden	14
2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösungen	14
2.1.2 Reinigung von DNA mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolfällung	14
2.1.3 Restriktion von DNA	14
2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus LM-Agarosegelen (QN-Extraktion)	15
2.1.5 Ligation	16
2.1.6 Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen (<i>E. coli</i>) zur Elektroporation	16
2.1.7 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	16
2.1.8 Glycerindauerkulturen von Bakterien	17
2.1.9 Plasmidisolierung aus Bakterien im kleinen Maßstab	17
2.1.10 Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab	18
2.1.11 TBE-Agarosegele	18
2.1.12 <i>In vitro</i> Mutagenese mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)	18
2.1.13 DNA-Sequenzierung	20
2.1.14 Induktion der Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	21
2.2 Proteinbiochemische Methoden	22
2.2.1 Denaturierende SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	22
2.2.2 Reinigung von Mutanten der Reversen Transkriptase von HIV-1	23
2.2.3 Farbstoffkopplung an Cysteinreste von RT-Mutanten mit einem freien Cystein	24
2.2.4 Kopplung von Nitroxid-Spinsonden an Cysteinreste von RT-Mutanten mit einem oder zwei freien Cysteinresten	25
2.3 Nukleinsäuren	26
2.3.1 Oligonukleotide	26
2.3.2 Farbstoff-markierte Oligodesoxynukleotide	26
2.3.3 Herstellung von DNA/DNA bzw. DNA/RNA Primer/Matrizen	26

2.4 Enzymkinetische Methoden	27
2.4.1 Pre-Steady-State Fluoreszenzmessungen (Stopped-Flow)	27
2.4.2 Gleichgewichts-Fluoreszenz-Messungen (Steady-State Ensemble-Messungen)	28
2.4.2.1 Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung von Dissoziationsgleichgewichts-konstanten und Dissoziationskonstanten von RT-Primer/Matrize Komplexen	28
2.4.2.1.1 Titrationsen	28
2.4.2.1.2 Bestimmung von Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (k_D)	29
2.4.2.1.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten (k_{off}) von RT-Primer/Matrize Komplexen	29
2.4.3 Bestimmung der RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität	30
2.5 Biophysikalische Methoden	31
2.5.1 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)	31
2.5.1.1 Allgemeine Grundlagen der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	31
2.5.1.2 Hyperfeinwechselwirkung	33
2.5.1.3 Anisotropie von A und g / Immobilisierungseffekte	35
2.5.1.4 ESR-Spektren Simulation zur Bestimmung von Interspinabständen	37
2.5.1.5 Aufbau des Elektronenspinresonanz-Spektrometers	38
2.5.1.6 Molekulardynamik-Simulationen	41
2.5.1.7 NNRTIs und dsDNA für ESR-Experimente	41
2.5.1.8 Probenvorbereitung	41
2.5.2. Fluoreszenzspektroskopie	41
2.5.2.1 Multidimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie durch BIFL	41
2.5.2.1.1 Meßanordnung / Konfokales Mikroskop	42
2.5.2.1.2 Datenaufnahme	43
2.5.2.1.3 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung	44
2.5.2.1.4 Fluoreszenzlebensdauerbestimmung: Maximum-Likelihood-Schätzer	44
2.5.2.1.5 Datenselektion	46
2.5.2.1.6 Datenanalyse durch integrierte Studien	48
2.5.2.1.7 Vielkanalzählerspur (MCS)	48
2.5.2.1.8 Konfokales Mikroskop	49
2.5.2.1.9 Laserlichtquellen	49
2.5.2.1.10 Teleskop und Linsen	49
2.5.2.1.11 Dichroitische Strahlteiler und Fluoreszenzfilter	50
2.5.2.1.12 Lochblende	50
2.5.2.1.13 Detektoren	50
2.5.2.1.14 Fluoreszenzstrahlteiler	50
2.5.2.1.15 Elektronische Datenverarbeitung	51
2.5.2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	51
2.5.2.3 Probenvorbereitung	52
2.6 Verwendete Materialien	53
2.6.1 Zellstamm	53
2.6.2 Plasmide	53
2.6.3 Enzyme	54
2.6.3.1 Restriktionsendonukleasen	54
2.6.3.2 DNA-modifizierende Enzyme	54
2.6.3.3 Chemikalien	54
2.6.3.4 Verbrauchsmaterialien	55
2.6.3.5 Medien und Puffer	55
3 Experimente und Ergebnisse	58
3.1. Klonierung, Expression und Reinigung von HIV-1 RT Mutanten	58
3.1.1 Zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe der überlappenden PCR	59

3.1.2 Expression der Untereinheiten p66 und p51 von HIV-1 RT und Aufreinigung der heterodimerem p66/p51-Mutanten	60
3.2 Markierung der RT-Mutanten mit MTSL-¹⁵N-d₁₅	62
3.3 Markierung der RT-Mutanten mit Alexa Fluor[®] 488 C5 maleimide	63
3.3.1 Bestimmung der Quantenausbeute von an RT gebundenem Alexa488	65
3.4 RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der RT-Mutanten im Vergleich zur HIV-1 Wildtyp RT	67
3.5 Dissoziationsgleichgewichtskonstanten und Dissoziationskonstanten von RT-Primer/Matrize Komplexen	69
3.5.1 Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (k_D) von RT-Primer/Matrize Komplexen	69
3.5.2 Dissoziationskonstanten (k_{off}) von RT-Primer/Matrize Komplexen	70
3.5.2.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Stopped-Flow ($k_{off} > 0,01 \text{ s}^{-1}$)	70
3.5.2.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten im Fluoreszenzspektrometer ($k_{off} < 0,01 \text{ s}^{-1}$)	74
3.6 Analyse der Konformation von HIV-1 RT mittels ESR-Spektroskopie	75
3.6.1 Konformation der Komplexe von HIV-1 RT-Mutanten in gefrorener Lösung	76
3.6.2 Konformation der Komplexe von HIV-1 RT-Mutanten in Lösung (T = 294 K)	79
3.6.2.1 Eigenschaften der einfach spinmarkierten HIV-1 RT-Mutanten	79
3.6.2.2 Konformation der ligandenfreien und komplexierten HIV-1 RT-Mutante RT ^(W24C-R1, K287C-R1)	80
3.6.2.3 Temperaturabhängigkeit der ESR-Spektren	83
3.6.2.4 Konformation von HIV-1 RT-NNRTI Komplexen in Lösung	86
3.7 Analyse der Konformation von HIV-1 RT-Primer/Matrizen Komplexen mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie	87
3.7.1 Darstellung der Ergebnisse der Einzelmolekül-Experimente in 2D-Diagrammen	89
3.7.2 Meßergebnisse der Einzelmolekül-Experimente	92
3.7.2.1 Alexa488 markierte RT-Mutanten RT ^(K281C) und RT ^(K287C)	92
3.7.2.2 RT ^(K281C-Alexa488) im Komplex mit DNA/DNA und DNA/RNA Substraten	92
3.7.2.3 RT ^(K287C-Alexa488) im Komplex mit DNA/DNA und DNA/RNA Substraten	96
3.7.2.4 Bestimmung der Anteile der unterschiedlichen Spezies in den RT-Nukleinsäure Komplexen	100
4 Diskussion	107
4.1 Polymeraseaktivität und Substratbindungseigenschaften der RT-Mutanten	107
4.2 Konformation der Reversen Transkriptase von HIV-1 in Lösung	108
4.3 Analyse der Konformation von RT-Primer/Matrize Komplexen mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie	112
4.4 Zusammenfassung	119
4.5 Ausblick	120
5 Literatur	121
6 Anhang	129
6.1 Oligodesoxyribonukleotide (Sequenz: 5' → 3')	129

6.2 Oligoribonukleotid (Sequenz: 5' → 3')	129
6.3 2D-Diagramme der Einzelmolekül-Experimente	129
6.3.1 2D-Diagramme zu den zeitaufgelösten Experimenten (Tabellen 3.7.2.4-2 - 3.7.2.4-6)	129
6.3.1.1 Experimente mit RT ^(K281-Alexa488)	130
6.3.1.2 Experimente mit RT ^(K287-Alexa488)	131
6.3.2 2D-Diagramme der Einzel-Messungen (Abbildung 3.7.2.1-1 - Abbildung 3.7.2.3-2)	132

Abkürzungen

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Alexa488	Alexa Fluor™ 488 C5 maleimide, sodium salt
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BIFL	Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime
BI-RG 587	<i>11-Cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido{3,2-b:2',3'-e}-(1,4)diazepin-6-one</i>
BP	Baasenpaar
C	Cystein
Ci	Curie
cpm	<i>counts per minute</i>
Cys	Cystein
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleicacid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Fab	<i>fragment antigen binding</i> , Antigen-bindendes proteolytisches Fragment eines Antikörpers
Flo1+4	Primer/Matrize Flo1/Flo4
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
HIV	humaner Immunschwächevirus
HOAc	Essigsäure

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HTLV	Humanes-T-Zell-Leukämie-Virus
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
k _D	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
KOAc	Kaliumacetat
LB	<i>Luria Broth</i>
LM	<i>lowmelting</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
Lys	Lysin
MeOH	Methanol
MTS	<i>methanthiosulfonate</i>
MTSL-Nd	MTSL- ¹⁵ N-d ₁₅
MTSL- ¹⁵ N-d ₁₅	(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-Δ ³ -pyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat- ¹⁵ N-d ₁₅
NaAc	Natriumacetat
Neverapine	BIRG 587
NH ₄ Oac	Ammoniumacetat
Ni-NTA	<i>Ni²⁺-nitrilotriacetic acid</i>
OD	optische Dichte
p.A.	<i>pro Analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Primer-Bindungs-Stelle
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PPT	<i>poly purine tract</i>
PR	Protease
QN	Cetyltrimethylammoniumbromid
R1	MTSL- ¹⁵ N-d ₁₅
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNaseH	Ribonuklease H
RT	Reverse Transkriptase
RT ^(K287C)	p66 ^(C38S, C280S, K287C) /6H-p51 ^(C280S)

RT ^(W24C)	p66 ^(W24C,C38S, C280S) /6H-p51 ^(C280S)
RT ^(W24C, K287C)	p66 ^(W24C,C38S, C280S, K287C) /6H-p51 ^(C280S)
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
SELEX	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
STE	<i>sodium-Tris-EDTA</i>
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N', Tetramethylethylendiamin
TIBO	<i>Tetrahydroimidazo(4,5,1-jk)(1,4)-benzodiazepin-2(1H)-one und -thione</i>
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
Trp	Tryptophan
U	<i>unit</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	volume/volume
W	Tryptophan
w/v	weight/volume

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Retroviren wurden 1911 von Peyton Rous bei Hühnern als filtrierbares, krebserregendes Agens (**Rous Sarkom Virus RSV**) entdeckt und gehören damit zu den am längsten bekannten Viren^[1]. In den 70er Jahren erkannte man, daß Retroviren auch bei Säugetieren, wie z.B. Mäusen, die Ursache von Krebs und Leukämie (**Mäuse Leukämie Virus MLV** und **Mouse Mammary Tumor Virus MMTV**) sein können^[2,3]. Retroviren können bei Menschen Leukämie, durch die T-Zell-Leukämie-Viren HTLV-1 und HTLV-2 sowie die erworbene Immunschwäche AIDS (**Acquired Immunodeficiency Syndrom**), durch die humanen Immunschwächeviren HIV-1 und HIV-2, hervorrufen^[4,5,6,7].

Der Aufbau von Retroviren ist mit dem von anderen tierischen Viren vergleichbar. Sie unterscheiden sich jedoch von diesen in zwei wesentlichen Merkmalen:

- a) Retroviren besitzen ein RNA Genom, das über ein DNA-Intermediat repliziert wird. Bei diesem Vorgang, der als reverse Transkription bezeichnet und von dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) katalysiert wird, fließt die genetische Information von der RNA zur DNA^[8,9]. Bis zur Entdeckung der Reversen Transkriptase, im Jahre 1970, wurde dieser Weg des genetischen Informationsflusses angezweifelt, da er im Gegensatz zum zentralen Dogma der Biologie steht, das besagt, daß die genetische Information von der DNA über die RNA zum Protein fließt^[10].
- b) Die gebildete doppelsträngige DNA wird irreversibel in das Wirtsgenom integriert.

In den vergangenen Jahren ist das Interesse an der Erforschung der Retroviren HIV-1 und HIV-2, aus medizinischen Gründen, gewachsen. Doch obwohl sie mittlerweile zu den best untersuchten Viren zählen, konnte bisher kein wirksames Medikament zur Heilung von HIV-Infektionen gefunden werden. Alle momentan verfügbaren Wirkstoffe und speziell die Kombination verschiedener Wirkstoffe können den Krankheitsverlauf zwar verlangsamen, die erworbene Immunschwäche verläuft jedoch in den allermeisten Fällen tödlich.

1.2 Aufbau von Retroviren

In Abbildung 1 ist der Aufbau von Retroviren am Beispiel von HIV-1 dargestellt. Die äußere Hülle (Membran) des Virions besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, in die transmembrane Glykoproteine (gp41) eingelagert sind. Auf der Oberfläche befinden sich Glykoproteine (gp120), die nicht kovalent an das gp41 gebunden sind^[11,12]. Das Matrixprotein bildet eine

innere Hülle, die zwischen der Membran und dem Nukleokapsid des Virions lokalisiert ist. Im Nukleokapsid, daß vom Kapsidprotein umgeben ist, befinden sich zwei genomische RNA-Moleküle, an die jeweils eine tRNA, ca. 70-100 RT-Moleküle und mehrere Nukleokapsidproteine gebunden sind. Desweiteren enthält der Kern des Virions mehrere Integrase- und Protease-Moleküle.

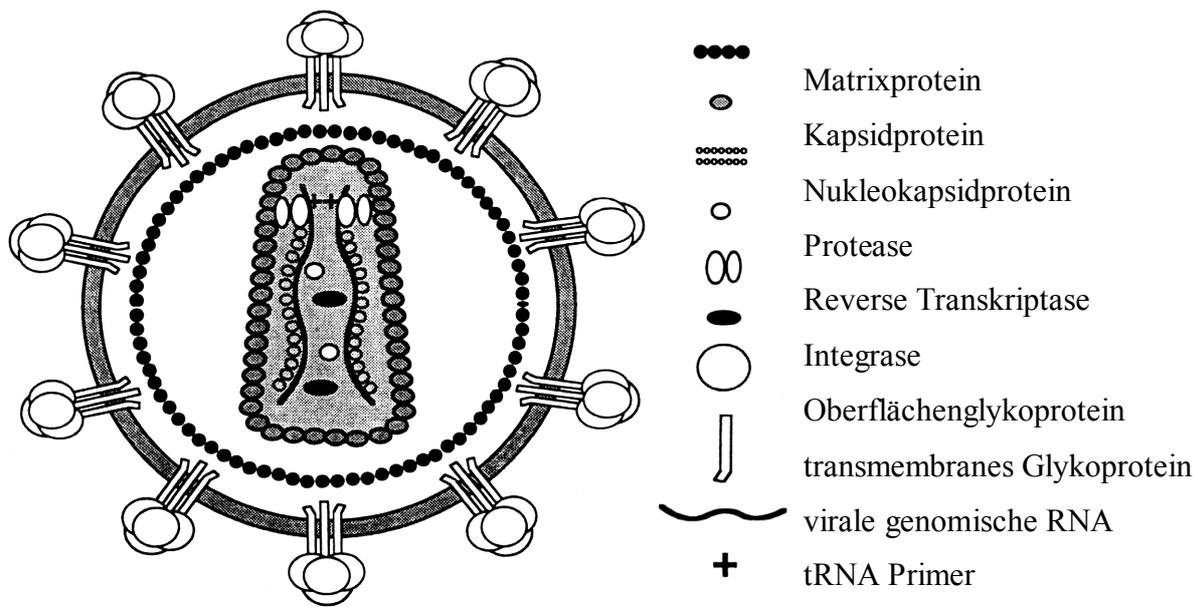


Abb. 1: Schematische Darstellung des humanen Immunschwächevirus HIV-1^[12].

HIV infiziert Zellen des Immunsystems, Makrophagen und sogenannte T4-Helferzellen, die eine entscheidende Rolle bei der natürlichen Bekämpfung von Infektionen spielen. Hierdurch wird die Immunantwort des Körpers auf Infektionen gestört. Die T4-Helferzellen tragen ein Rezeptormolekül, das ein wichtiges Glied im Replikationszyklus von HIV darstellt.

1.3 Der Replikationszyklus von HIV

Zu Beginn des Replikationszyklus (vgl. Abbildung 1.3-1) bindet das virale Glykoprotein gp120, das sich in der Lipidhülle des Virions befindet, an ein CD4-Rezeptormolekül und ein Korezeptormolekül (CCR5 oder CXCR4), die beide auf der Oberfläche von T4-Helferzellen oder Makrophagen lokalisiert sind^[13-18]. Durch die darauffolgende Fusion von Virus- und Wirtszellenmembran, gelangt das Kapsid des Virus in das Zytoplasma. Hier wird mit Hilfe der RT, die sich zusammen mit der viralen Integrase und der genomischen, viralen RNA im sogenannten Nukleoproteinkomplex befindet, die doppelsträngige provirale DNA (dsDNA) gebildet^[19,20]. Diese gelangt dann, gebunden an die virale Integrase und assoziiert mit dem Nukleoproteinkomplex, in den Zellkern, wo sie, katalysiert durch die virale Integrase, in das

Wirtsgenom integriert wird. Die zelluläre RNA Polymerase II transkribiert dann die provirale DNA, wodurch neue gespleißte und ungespleißte virale RNA entsteht, die in das Zytoplasma transportiert wird. Ein Teil der ungespleißten RNA und die gespleißte RNA dienen als mRNA für die Produktion der viralen Proteine^[21]. Jeweils zwei ungespleißte RNA-Moleküle und neu gebildete virale Polyproteine gelangen dann zur Plasmamembran, wo sie durch Knospung aus der Zelle das neue Virion konstituieren. Die äußere Membran des Virions bildet sich dabei aus der Lipidmembran der Wirtszelle, in die virale Glykoproteine eingelagert werden. Nach der Knospung reift das Virus durch Prozessierung der Polyproteine in funktionelle Proteine.

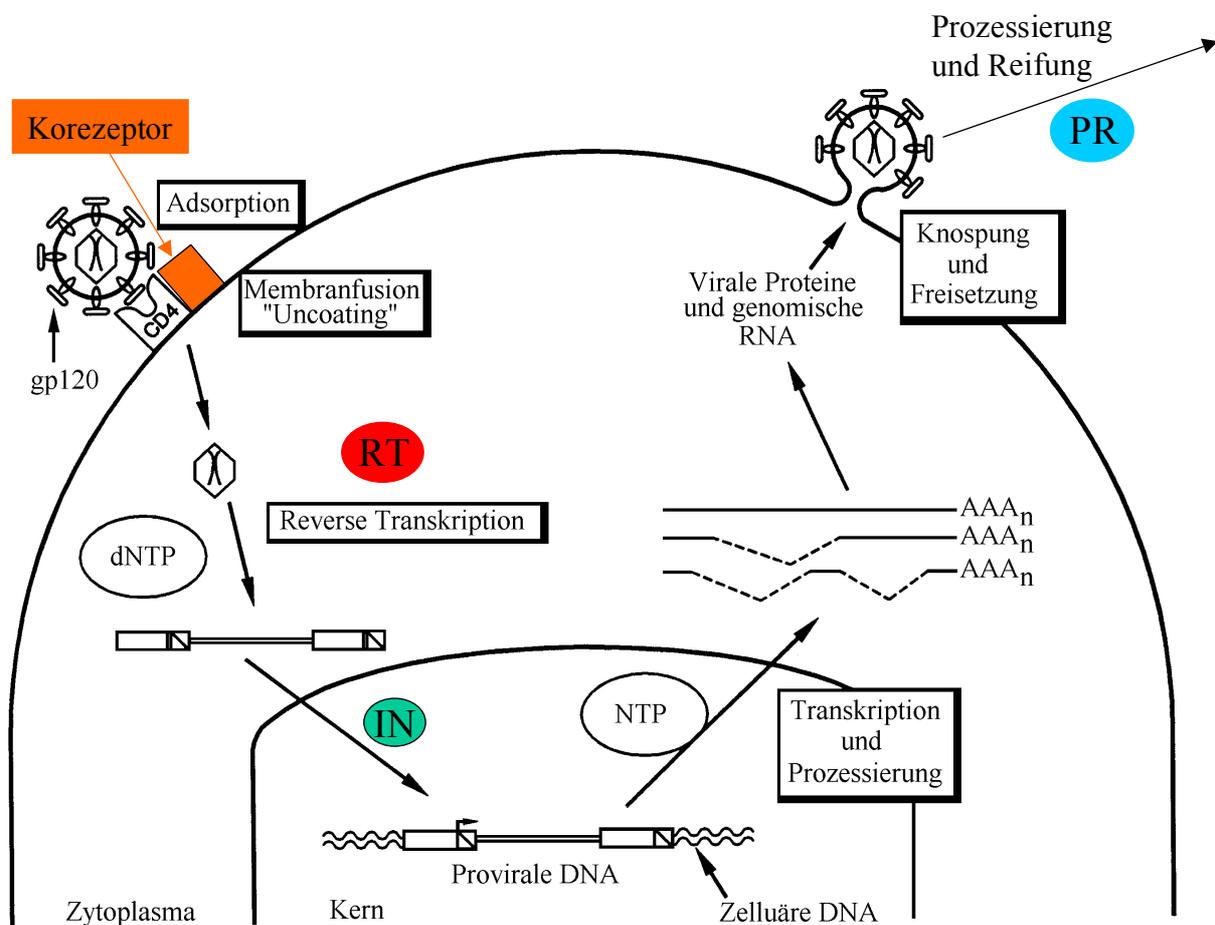


Abbildung 1.3-1: Replikationszyklus von HIV^[22].

1.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von viraler, genomischer, einzelsträngiger RNA in lineare, doppelsträngige DNA wird durch das Enzym RT katalysiert. Hierzu ist die RT mit einer RNA- und einer DNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität ausgestattet. Zusätzlich besitzt die RT eine RNaseH-Aktivität, die RNA in einem RNA/DNA-Hybrid endonukleolytisch schneidet.

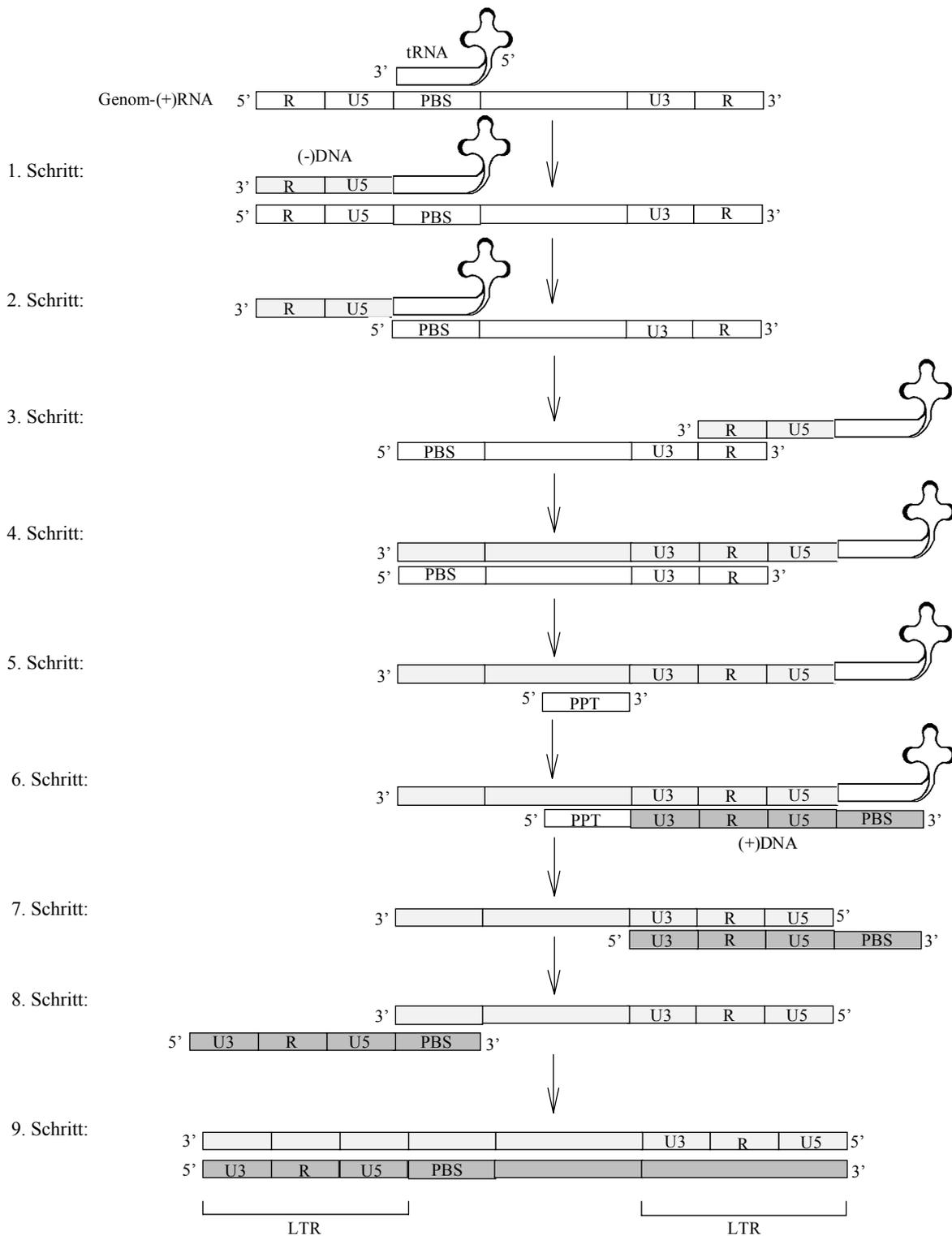


Abbildung 1.4-1: Umwandlung der Genom-(+)RNA eines Retrovirus in eine doppelsträngige provirale DNA. Die (+)RNA ist weiß (□), die (-)DNA mittelgrau (▒) und die (+)DNA dunkelgrau (■) dargestellt^[23].

Abbildung 1.4-1 zeigt schematisch die Umwandlung von genomischer (+)-RNA eines Retrovirus in doppelsträngige provirale DNA. Eine in das Virion aufgenommene Wirts-tRNA lagert sich in der Nähe des 5'-Endes der viralen RNA an die Primer-Bindestelle (PBS) an. Die tRNA wird dann, mit Hilfe der RT, bis zum 5'-Ende der RNA-Matrize verlängert, wobei die

U5- und die R-Region kopiert werden (1. Schritt). Die R-Region ist als terminale Redundanz zweimal in der RNA enthalten. Durch die RNaseH-Aktivität der RT wird dann der RNA-Anteil des gebildeten RNA/DNA-Hybrids hydrolysiert (2. Schritt). Anschließend hybridisiert die R-Region des neuen DNA-Stranges mit der komplementären R-Region am 3'-Ende der RNA (3. Schritt). Diesen intra- oder intermolekularen Vorgang bezeichnet man als ersten Sprung (first jump). Danach wird der (-)DNA-Strang verlängert und gleichzeitig die schon kopierte RNA abgebaut (4. und 5. Schritt). Zurück bleibt eine Region, die als polypurinreiche Region oder PPT (polypurine tract) bezeichnet wird. Diese Region kann nicht durch die RNaseH-Aktivität der RT abgebaut werden und dient im nächsten Schritt als Primer für die (+)DNA-Synthese. Ausgehend vom PPT-Primer wird (+)DNA synthetisiert, wobei die (-)DNA als Matrize benutzt wird. Die Synthese stoppt, nachdem die PBS-Region am 3'-Ende der (+)DNA vervollständigt ist (6. Schritt). Der PPT-Primer sowie die tRNA werden durch die RNaseH-Aktivität der RT abgetrennt (7. Schritt). Die PBS-Regionen der (+)DNA und (-)DNA sind komplementär und hybridisieren (8. Schritt). Diese Umlagerung wird als zweiter Sprung (second jump) bezeichnet. Abschließend werden die (+)DNA- und (-)DNA-Stränge vervollständigt. Das Produkt ist eine lineare, doppelsträngige DNA, die zwei LTRs (long terminal repeats) enthält und in das Wirtsgenom integriert werden kann (9. Schritt). Die LTRs des Provirus, die in der genomischen RNA nur teilweise enthalten sind, sind essentiell für die Expression der RNA und die Integration des Provirus in das Wirtsgenom.

1.5 Struktur der RT von HIV-1

Die biologisch relevante Form der HIV-1 RT ist ein Heterodimer, das aus einer 66 kDa- und einer 51 kDa-Untereinheit (p66 und p51) besteht. Die Aminosäuresequenzen der beiden Untereinheiten sind identisch, jedoch besitzt nur die p66-Untereinheit katalytische Aktivität. Die p51-Untereinheit wird im Virus mit Hilfe der viralen Protease durch proteolytische Spaltung der p66-Untereinheit gebildet^[24]. Die monomeren Formen von p51 und p66 besitzen keine katalytische Aktivität^[25].

Die Abbildung 1.5-1 zeigt die Röntgen-Kristallstruktur von HIV-1 RT gebunden an eine 18/19mer DNA/DNA^[26]. Die p66-Untereinheit kann in fünf Subdomänen aufgegliedert werden. Die drei N-terminalen Subdomänen bilden die Polymerase-Domäne, die vierte, die sogenannte Verbindungs-Domäne (connection, gelb), verbindet die Polymerase- mit der RNaseH-Domäne (orange). Da die Polymerase-Domäne der p66- Untereinheit einer rechten Hand ähnelt, bezeichnet man die ersten drei Subdomänen mit Finger (fingers, blau), Daumen

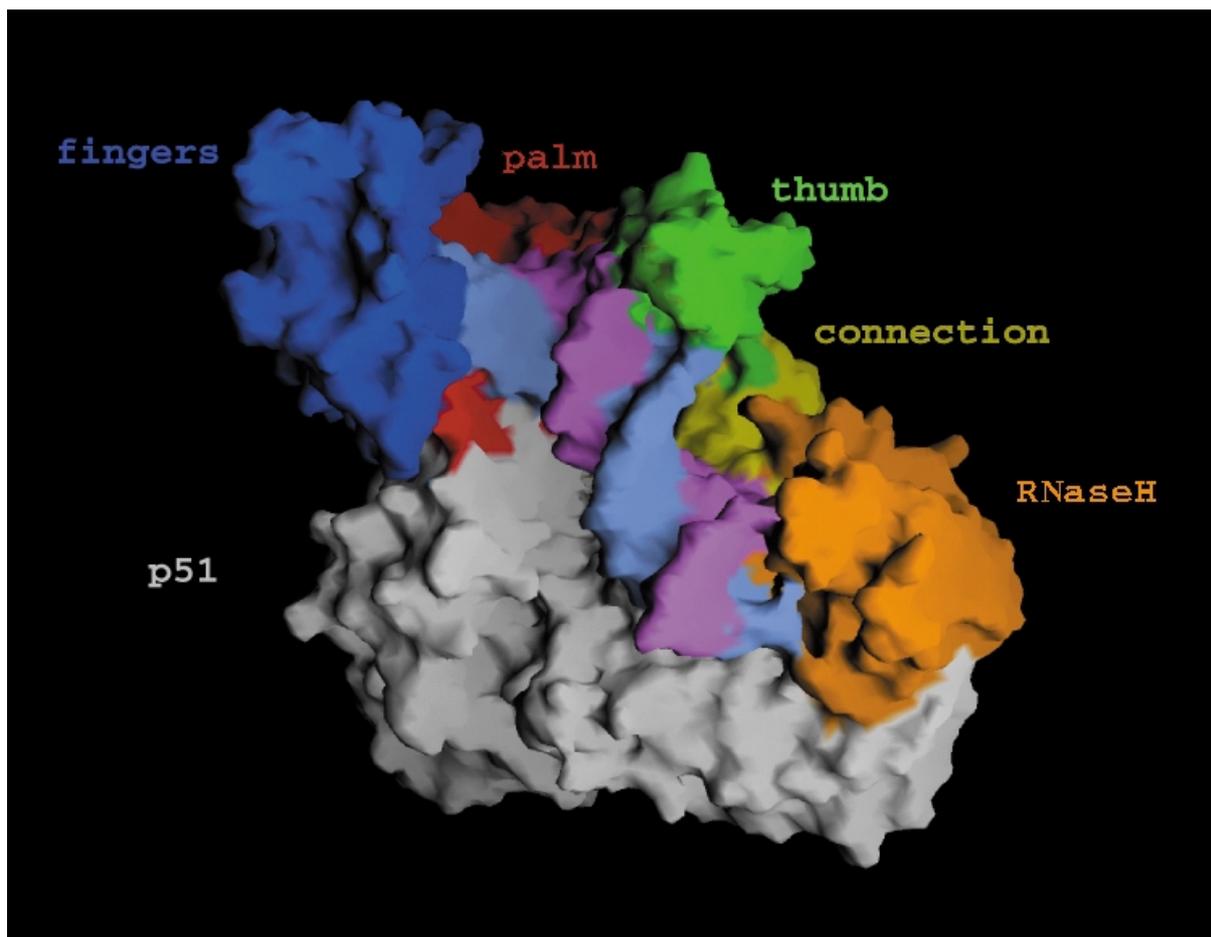


Abbildung 1.5-1: Kristallstruktur der HIV-1 RT im Komplex mit einer 18/19mer DNA/DNA, die in magenta/hellblau gezeigt ist^[26]. Die p66-Untereinheit der RT ist ebenfalls farbig dargestellt, die p51-Untereinheit ist grau gefärbt.

(thumb, grün) und Handfläche (palm, rot). Auch die p51- Untereinheit (grau), in der die RNaseH-Domäne fehlt, besteht aus den vier Subdomänen, die allerdings anders angeordnet sind. Im Gegensatz zur p66-Untereinheit bildet die p51-Untereinheit keine Furche für die Bindung eines Nukleinsäure-Substrates. Dieser Untereinheit werden vorwiegend strukturelle Aufgaben zugeschrieben.

Neben der in Abbildung 1.5-1 gezeigten Kristallstruktur wurden noch weitere Röntgen-Kristallstrukturen der HIV-1 RT gelöst. Darunter befinden sich Strukturen von ligandenfreier RT^[27,28], RT im Komplex mit einer pseudoknot-RNA^[29] und RT im Komplex mit nicht-nukleosidischen Inhibitoren^[30,31,32].

Vergleicht man alle verfügbaren Strukturen so fällt auf, daß sie sich im Wesentlichen in der Position der Daumen-Domäne unterscheiden. Abhängig von der Lage der Daumen-Domäne unterscheidet man zwischen einer offenen und einer geschlossenen Konformation der RT. Der Übergang zwischen diesen beiden Konformationen geht mit einer 30° - 40° Rotation der Daumen-Domäne, relativ zur Handflächen-Domäne, einher (vgl. Abbildung 1.5-2). Die

offene Konformation findet man in Kristallstrukturen von RT in Komplexen mit dsDNA und nicht-nukleosidischen Inhibitoren. Die Kristallstruktur der ligandenfreien RT zeigt die geschlossenen Konformation. Zusätzliche, kleinere strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Konformationen sind in der RNaseH-Domäne und der Finger-Domäne zu erkennen.

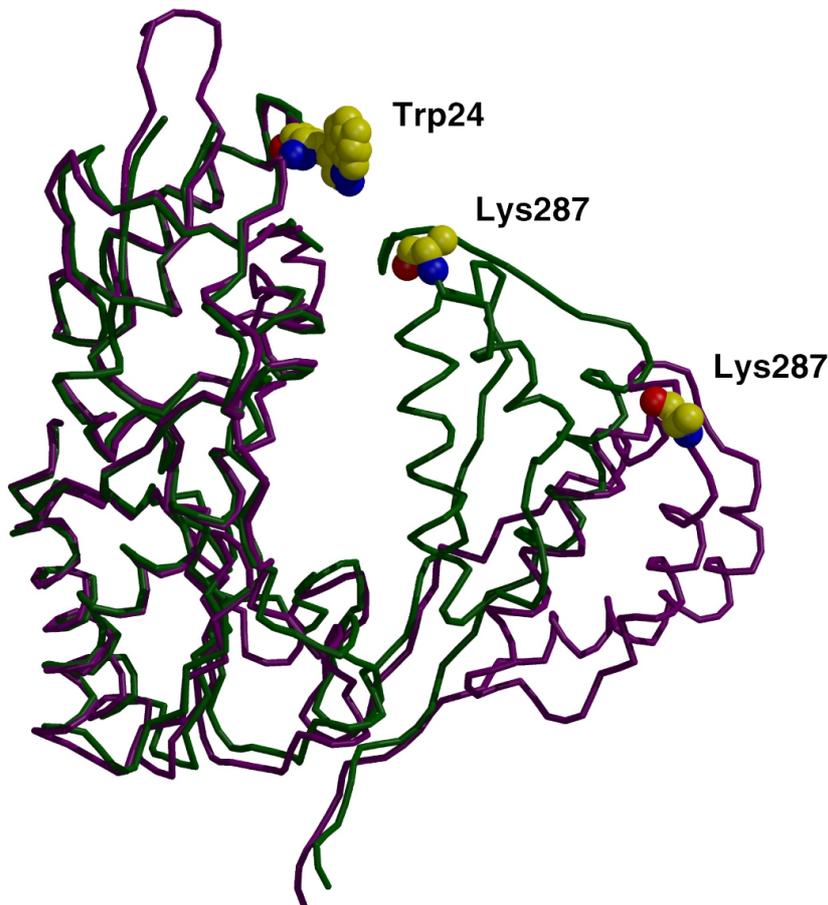


Abbildung 1.5-2: Kristallstruktur der Finger- und Daumen-Domäne der p66-Untereinheit von ligandenfreier HIV-1 RT (grün, ^[27]) und RT im Komplex mit dsDNA (lila^[28]). Die Nukleinsäure ist aus Übersichtsgründen nicht gezeigt. Die verschiedenen Konformationen führen zu verschiedenen Abständen zwischen den Resten Trp24 und Lys287 (Kugeldarstellung).

Die Daumen-Domäne der p66-Untereinheit besitzt eine außergewöhnlich große Flexibilität (s.o.). Es ist daher vorstellbar, daß diese Flexibilität eine Funktion hat. Da die Daumen-Domäne an der Bindung des Nukleinsäure-Substrates beteiligt ist und einen Teil der Polymerase-Domäne darstellt, kann man vermuten, daß sie u.a. an der richtigen Positionierung des 3'-Endes des Primerstranges im aktiven Zentrum der Polymerase-Domäne beteiligt ist. Diese Positionierung spielt eine wichtige Rolle in der Polymerasereaktion, da nach jedem Einbau eines Nukleotids das 3'-Endes des Primerstranges erneut positioniert werden muß. Eine genauere Kenntnis über die Konformation und Dynamik der Daumen-

Domäne ist daher für ein Verständnis des Mechanismus der Polymerasereaktion von Interesse. Bislang gibt es keine Informationen über die Konformation/Dynamik der Polymerase-Domäne, bzw. die Lage der Daumen-Domäne, in Lösung. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Konformationen der Polymerase-Domäne, bzw. der Lage der Daumen-Domäne der HIV-1 RT in Lösung zu analysieren.

1.6 Substratbindung und Nukleotideinbau durch HIV-1 RT

RTs von Retroviren, wie HIV, sind sehr vielseitige Enzyme. Um die reverse Transkription katalysieren zu können, besitzen sie mehrere enzymatische Aktivitäten (RNA-abhängige DNA-Polymerase-, DNA-abhängige-DNA-Polymerase- und RNaseH Aktivitäten). Im Verlauf der reversen Transkription müssen sie in der Lage sein mit einem Spektrum von unterschiedlichen Nukleinsäure-Substraten (Primer/Matrizen) in Wechselwirkung zu treten, wobei folgende Situationen in Bezug auf die Struktur der Primer/Matrize vorkommen:

- a) tRNA/RNA (natürlicher Initiationskomplex; Initiation der (-)Strangsynthese)
- b) DNA/RNA (Elongationsphase der (-)Strangsynthese)
- c) RNA/DNA (Initiation der (+)Strangsynthese vom Polypurintrakt)
- d) DNA/DNA (Elongationsphase der (+)Strangsynthese)

Um diese verschiedenen Nukleinsäure-Substrate, die sich in ihrer Struktur stark unterscheiden, binden zu können muß das Enzym eine relative große Anzahl von unterschiedlichen Konformationen annehmen können. Allein die Tatsache, daß die Domänen in der p51-Untereinheit eine andere räumliche Anordnung als in der p66-Untereinheit aufweisen, deutet auf diese konformationelle Flexibilität hin. Konkrete Hinweise auf größere Strukturänderungen während der enzymatischen Katalyse stammen aus einem Vergleich der Strukturen der RT in Abwesenheit von Liganden und in Anwesenheit einer DNA/DNA (vgl. 1.5). Hier sieht man eine eindeutige Bewegung der sogenannten Daumendomäne. Allerdings liegen bisher keine direkten Hinweise auf das Vorkommen solcher Strukturänderungen in Lösung vor, weder zwischen verschiedenen Nukleinsäure-gebundenen Zuständen noch während der Katalyse.

Für die RT von HIV-1 wurden zwei Röntgen-Kristallstrukturen des Enzyms im Komplex mit einer DNA/DNA aufgeklärt. Eine zeigt die RT gebunden an eine 18/19mer DNA/DNA (vgl. Abbildung 1.5-1)^[26]. Die zweite stellt den Komplex aus RT und einer 25/21mer DNA/DNA dar, die kovalent an das Enzym gebunden ist. Der 21mer Primerstrang ist hierbei am 3'-Ende mit einem Didesoxynukleotid terminiert. Dies ermöglicht die Bindung eines dNTPs, hier

eines dTTPs, am aktiven Zentrum der Polymerase-Domäne, ohne daß dieses in den Primerstrang eingebaut werden kann. Diese Struktur simuliert die Konformation von Enzym, Nukleinsäure und dNTP in einem katalytisch aktiven Komplex.

In beiden RT-DNA/DNA Komplexen ist die Nukleinsäure jeweils so an das Protein gebunden, daß sich das 3'-Ende des Primerstranges in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne befindet. In dieser Konformation kann ein dNTP am aktiven Zentrum binden, mit dem Matrizenstrang eine Basenpaarung eingehen und durch die DNA-abhängige Polymerasefunktion der RT in den Primerstrang eingebaut werden.

Würden in Lösung alle RT-Substrat Komplexe in der Konformation vorliegen, die die Kristallstrukturen zeigen, so würde man erwarten, daß in einem Experiment, in dem alle Substratmoleküle von der RT gebunden sind, die Kinetik des Einbaus eines Nukleotids durch eine einfach exponentielle Gleichung zu beschreiben ist. In Pre-Steady-State Analysen des Nukleotideinbaus konnten allerdings drei Geschwindigkeiten für diese Reaktion, mit Geschwindigkeitskonstanten von $20\text{-}60\text{ s}^{-1}$, $4\text{-}7\text{ s}^{-1}$ und ca. $0,1\text{ s}^{-1}$ nachgewiesen werden^[33].

Detaillierte Untersuchungen zur Substratbindung von HIV-1 RT geben Hinweise auf die Existenz unterschiedlicher RT-Substrat Komplexe in Lösung^[33]. Hierbei wurde, ebenfalls durch Pre-Steady-State Analysen, die Geschwindigkeit der Substratbindung untersucht, wobei der Nukleotideinbau als Signal für die Substratbindung diente. Dadurch konnten drei verschiedenen Komplexe identifiziert werden.

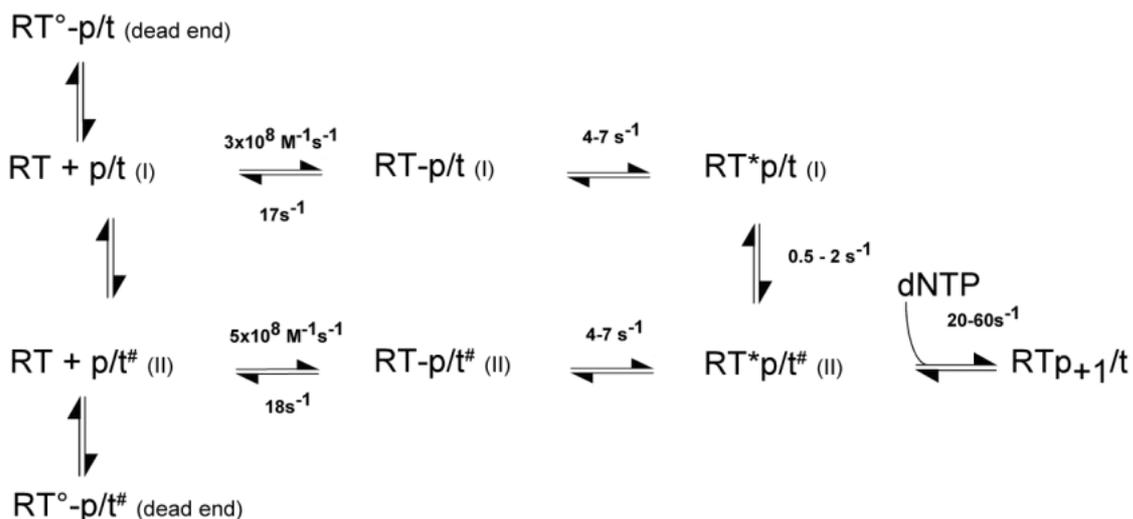


Abbildung 1.6-1: Ein Modell des kinetischen Mechanismus der HIV-1 RT-Substrat-Wechselwirkung. Die Symbole °, # und * kennzeichnen verschiedene strukturelle Zustände der entsprechenden Protein-Nukleinsäure Komplexe. p/t (primer/template): Primer/Matrize^[33].

Aus den Ergebnissen der Analysen zum Nukleotideinbau und zur Substratbindung wurde ein Modell des kinetischen Mechanismus der HIV-1 RT-Substrat-Wechselwirkung, das in Abbildung 1.6-1 dargestellt ist, entwickelt. Das Modell besagt, daß ein gewisser Anteil des Substrates, in einem zweistufigen Bindungsprozeß produktiv an die RT gebunden wird. Dieser Komplex baut Nukleotide mit einer Geschwindigkeit von 20-60 s⁻¹ ein. Geschwindigkeitsbestimmend ist hierbei eine Konformationsänderung des ternären Komplexes aus RT, Nukleinsäure und dNTP. Ein weiterer Teil des Substrates bindet unproduktiv und wird durch eine Konformationsänderung in den produktiven Komplex umgewandelt. Ein dritter Anteil bindet ebenfalls unproduktiv und kann erst nach Dissoziation und nachfolgender Reassoziaton des Substrates in den produktiven Komplex übergehen (dead end). Die genaue Verteilung dieser drei RT-Nukleinsäure Komplexe ist hierbei abhängig von der Natur des Substrates (DNA/DNA, DNA/RNA oder RNA/RNA).

Das Modell des kinetischen Mechanismus der HIV-1 RT-Substrat-Wechselwirkung gibt wichtige Hinweise auf das Wechselspiel von Struktur und Funktion in RT-Substrat Komplexen. So steht fest, daß die räumliche Anordnung von RT und Substrat im unproduktiven „dead end“-Komplex keinen Nukleotideinbau erlaubt. Ebenfalls kann man feststellen, daß im zweiten unproduktiven Komplex eine strukturelle Änderung stattfinden muß, bevor dieser in den produktiven Komplex übergeht. Die Orientierung von Enzym und Substrat in diesen Komplexen bleibt allerdings völlig unklar. Zum tieferen Verständnis des gesamten Polymerisationsmechanismus ist es daher notwendig, strukturelle Informationen über die unterschiedlichen Komplexe zu bekommen. In dieser Arbeit sollten daher, ausgehend von dem vorgestellten kinetischen Modell, solche Strukturinformationen über RT-Primer/Matrize Komplexe mit einer neuartigen Methode erarbeitet werden. Diese Methode kombiniert Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie mit Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) (siehe 1.9).

1.7 Strukturuntersuchungen

Die Kenntnis einer detaillierten Proteinstruktur ist eine unabdingbare Voraussetzung für das Verständnis der Funktionsweise eines Proteins. Die Struktur liefert einerseits Erklärungsansätze für Reaktionsmechanismen und stellt andererseits die Grundlage für das Design biochemischer Analysen dar. Röntgen-Kristallstruktur-Analysen und multidimensionale Kernspinresonanz-Spektroskopie ermöglichen einen detaillierten Einblick in Struktur-Funktionsbeziehungen von Proteinen. Ein entscheidender Nachteil der Röntgen-Kristallstruktur-Analyse ist allerdings, daß sie nur ein statisches Bild liefert und keine

Aussagen über die Dynamik zuläßt. Informationen über die Struktur eines Makromoleküls in Lösung kann z.B. die multidimensionale Kernspinresonanz-Spektroskopie liefern, wobei die Größe der zu untersuchenden Proteine bislang auf ca. 30 kDa beschränkt ist. Daher können beide Methoden keinen genauen Aufschluß über die Dynamik von Protein-Substrat-Wechselwirkungen (> 30 kDa) in Lösung geben.

In dieser Arbeit wurden zwei spektroskopische Methoden, die ESR- und Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie angewendet, die diesen Restriktionen nicht unterliegen und es daher ermöglichen, die Konformation der HIV-1 RT und ihrer Substratkomplexe in Lösung zu analysieren.

1.8 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Die gezielte Analyse der Struktur von Proteinen mittels ESR-Spektroskopie wird durch gentechnische Methoden ermöglicht. Während an Proteine gebundene paramagnetische Metallionen nur die Analyse bestimmter kleiner Bereiche eines Proteins ermöglichen, kann mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese an nahezu jede Stelle des Proteins ein Cysteinrest eingeführt werden, der anschließend mit speziellen Nitroxid-Spinsonden markiert werden kann. Die Analyse der ESR-Spektren, die man durch diese Spinsonden erhält, gibt Aufschluß über eine Vielzahl von strukturellen Merkmalen des jeweiligen Proteins. So hat sich diese Art der Spinmarkierung von Proteinen als äußerst nützliche Technik zur Analyse der Struktur und Dynamik von wasserlöslichen und Membranproteinen bewährt^[34,35]. Beispielsweise konnte durch gezielte Markierung mit einzelnen Spinsonden die Sekundär- und Tertiärstruktur von Membranproteinen wie Rhodopsin und Bakteriorhodopsin analysiert werden^[36]. Hierbei ermöglichte die Analyse der Dynamik der Spinsonden-Seitenkette die Bestimmung der Orientierung von Sekundärstrukturelementen von Proteinen und deren Topographie in Bezug auf eine Membran-Wasser Grenzfläche.

Markiert man ein Makromolekül mit zwei oder mehr Spinsonden, die einen Abstand kleiner $\sim 25\text{\AA}$ aufweisen, führt dies zu Veränderungen in der Linienform der ESR-Spektren, die auf dipolare Wechselwirkungen zwischen den Spinsonden zurückzuführen sind. Durch eine Analyse der Linienform kann auf den Abstand zwischen den Spinsonden geschlossen werden^[37]. Dadurch erhält man ein Werkzeug zur Abstandsbestimmung zwischen nahezu beliebigen Positionen (mit einem Abstand $\leq 25\text{\AA}$) in einem Protein. Diese Technik wurde u.a. benutzt, um Domänenbewegungen in verschiedenen Proteinen zu analysieren^[38-40].

1.9 Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie

In den letzten Jahren sind in dem Bereich der Einzelmolekül-Fluoreszenzdetektion erhebliche Fortschritte erzielt worden^[41,42]. Einzelmolekül-Experimente ermöglichen die detaillierte Analyse einzelner Moleküle. Daraus ergeben sich entscheidende Vorteile gegenüber der konventionellen Fluoreszenzspektroskopie, bei der ein Ensemble von Molekülen analysiert wird. Es findet keine Mittelung der Fluoreszenzsignale verschiedener Moleküle mit evtl. unterschiedlichen Eigenschaften statt. Einzelne fluoreszenzmarkierte Biomoleküle können, frei diffundierend, in Lösung detektiert werden. Ebenfalls ist eine Analyse von immobilisierten Molekülen möglich.

Eine übliche Methode zur Messung von Einzelmolekülen ist die Anregung der Fluorophore durch Laser in einem Volumenelement, das durch ein konfokales Mikroskop generiert wird. Bedingt durch die geringe Größe des konfokalen Volumens (~ 1 fl), in dem gleichzeitig die Anregung und die Detektion der Fluoreszenz stattfindet, halten sich die zu analysierenden Moleküle, bei freier Diffusion in Lösung, nur für wenige Millisekunden im Detektionsbereich auf. Dadurch ist der Zeitrahmen für die Betrachtung eines einzelnen Moleküls begrenzt. Allerdings können viele Ereignisse (Photonen-Bursts), die von einzelnen Molekülen stammen, in recht kurzer Zeit aufgenommen werden. Abhängig vom experimentellen Aufbau können Fluoreszenzparameter wie Intensität, Spektralbereich, Polarisation, Fluoreszenzlebensdauer und Aufenthaltsdauer ermittelt werden. Durch eine statistische Auswertung der Fluoreszenzparameter können dann Subpopulationen der analysierten Moleküle oder Komplexe identifiziert, separiert und quantifiziert werden^[43,44].

Um Aussagen über die Konformation von RT-Primer/Matrize Komplexen treffen zu können, benötigt man Informationen über die relative Orientierung von RT und Nukleinsäure. Die relative Orientierung kann durch die Bestimmung des Abstandes bestimmter Positionen innerhalb der beiden Bindungspartner eines Komplexes ermittelt werden. In der Fluoreszenzspektroskopie macht man sich das Phänomen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zur Abstandsbestimmung zu Nutze. Hierbei ist der Transfer von Energie zwischen zwei Fluorophoren abhängig von ihrem Abstand. Daher erlaubt es diese Methode Aussagen über den Abstand zwischen zwei fluoreszenzmarkierten Positionen in einem Molekül/Komplex zu treffen.

In dieser Arbeit wurde die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie mit der FRET-Methode verknüpft, wodurch es prinzipiell möglich ist zwischen verschiedenen Konformationen von Enzym-Substrat Komplexen in einer Mischung zu unterscheiden, wenn sowohl das Enzym als auch das Substrat mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist.

1.10 Ziele der Arbeit

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten das Verständnis der Struktur der RT und ihrer Nukleinsäure-Komplexe im Hinblick auf den Mechanismus der Polymerisationsreaktion verbessern. Hierzu sollten unter Anwendung der ESR- und Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie Testsysteme entwickelt werden, die es ermöglichen die notwendigen strukturellen Informationen zu ermitteln.

So sollte zum einen untersucht werden, ob die Polymerase-Domäne in Lösung in einer offenen oder geschlossenen Konformation vorliegt. Hierzu sollten, durch ESR-Spektroskopie an zweifach spinmarkierter RT, Abstände zwischen der Daumen- und Finger-Domäne ermittelt werden.

Zum anderen sollte die Kombination aus FRET und Einzelmolekülspektroskopie zur Analyse der Konformation von RT-Nukleinsäure Komplexen sowie zur Identifizierung und Quantifizierung unterschiedlicher Komplexe in Gemischen etabliert werden. Dazu sollte die RT ortsspezifisch mit Fluorophoren markiert und im Komplex mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösungen

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen wurde die optische Dichte der Lösungen bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Eine optische Dichte von eins entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml bei einzelsträngiger DNA und RNA sowie 30 µg/ml bei Oligonukleotiden.

2.1.2 Reinigung von DNA mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolfällung

Zur Reinigung von DNA wurden Phenol-/Chloroform-Extraktionen mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurden die DNA-Lösung mit einem Volumen Phenol und einem Volumen Chloroform versetzt. Nach Mischen der Lösungen und anschließender Zentrifugation für 2 min bei 10000 g wurde die wäßrige Phase abgenommen und nochmals mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die wäßrige Phase mit 1/20 Volumen 5 M NaAc und dem zweieinhalbfachen Volumen Ethanol versetzt. Nach Zentrifugation der Lösung (10 min, 10000 g, 4°C) wurde das gebildete Pellet zweimal mit kaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen.

2.1.3 Restriktion von DNA

Die Restriktionen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers der Restriktionsenzyme durchgeführt. Im Anschluß wurde entweder DNA-Probenpuffer zugesetzt oder eine Phenol-/Chloroform-Extraktion mit Ethanolfällung durchgeführt. Die einzusetzenden Enzymmenge (Einheiten) wurde unter Berücksichtigung der zu schneidenden DNA-Menge und der Anzahl ihrer Schnittstellen im Verhältnis zu der DNA wie folgt berechnet:

$$\text{Einheiten}_{\text{Enzym}} = \frac{\# \text{bp (DNA}_{\text{Def.}}) \cdot \# \text{ Schnittstellen (DNA)}}{\# \text{bp (DNA)} \cdot \# \text{ Schnittstellen (DNA}_{\text{Def.}})}$$

Hierbei bezeichnet der Index „Def.“ die Parameter auf die eine Einheit Enzym vom Hersteller definiert wurde.

2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus LM-Agarosegelen (QN-Extraktion)

Die bei einer Restriktion entstandenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt, die einzelnen Banden durch UV-Licht lokalisiert und wie folgt aus dem Gel extrahiert.

Die Banden des gewünschten Fragments wurden aus dem Gel ausgeschnitten, das Agarosestück in ein LM-Agarosegel (*'low melting'*) eingepaßt und die Elektrophorese fortgesetzt, bis die DNA vollständig in das LM-Gel übertragen war. Anschließend wurde die DNA-Bande aus dem LM-Agarosegel ausgeschnitten und das Fragment durch QN-Extraktion aus der Agarose eluiert.

QN (Cetyltrimethylammoniumbromid) ist ein quartäres Ammoniumsalz, das sich an Polyanionen (DNA) anlagert und diese aufgrund seiner lipophilen Alkylgruppen in organischen Lösungsmitteln löslich macht. Für die QN-Extraktion wurde eine 1%ige Lösung von QN in H₂O-gesättigtem Butanol hergestellt und mit einem Volumen Butanol-gesättigtem Wasser zu einer Emulsion vermischt. Durch Zentrifugation (5 min, 10000 g) der Emulsion wurden die Phasen getrennt und die für die Extraktion benötigten Volumina bei 65°C inkubiert.

Die DNA-haltige Agarose wurde 5 min bei 65°C aufgeschmolzen und mit jeweils dem einfachen Volumen an vorbereitetem QN/Wasser und QN/Butanol versetzt. Die Extraktion erfolgte durch intensives Mischen (mind. 30 s) auf einem Vortex-Mischer. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation (30 s, 10000 g) wurde die Butanol-Phase, die nun die DNA enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die wäßrige Phase wurde anschließend ein zweites Mal mit dem einfachen Volumen an Butanol-Lösung reextrahiert. Nach Vereinigung der Butanol-Phasen wurden diese zur Wasserabtrennung 1 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (30 s, 10000 g) und dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Extraktion der DNA aus der Butanol-Phase wurde diese mit ¼ Volumen 1M NaCl versetzt, wodurch das QN von der DNA verdrängt wurde und diese wieder in der wäßrigen Phase löslich wurde. Diese Suspension wurde nun insgesamt 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dabei zu Beginn und nach jeweils 10 min intensiv gemischt. Nach Zentrifugation der Suspension (1 min, 10000 g) wurde die wäßrige Phase von der Butanol-Phase getrennt. Abschließend wurde die wäßrige Phase dreimal mit CHCl₃ extrahiert, wobei vor der letzten Extraktion das Volumen der wäßrigen Phasen durch Zugabe von TE verdreifacht wurde. Überschüssiges CHCl₃ wurde bei 65°C abgedampft. Die Gesamtausbeute der Extraktionen beträgt etwa 80%.

2.1.5 Ligation

Für eine Ligation wurden zwischen 20 und 40 ng linearisierte Vektor-DNA (= 0,01 pmol) und die 10fache molare Menge an Fragment eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20 µl unter Zugabe von 4 µl 5 x Ligase-Puffer und 0,2 Einheiten T4 DNA-Ligase für 12-16 h bei 16°C.

2.1.6 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* -Zellen (*E.coli*) zur Elektroporation

1 l LB-Medium wurde mit 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,8 bei 37°C geschüttelt. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C mit vorgekühlten Gefäßen und Lösungen durchgeführt, um eine maximale Transformationsrate zu erreichen. Zur Sedimentation der Zellen wurde die gesamte Kultur zentrifugiert (GS3-Rotor, 7000 upm, 15 min, 4°C), und in 1 l Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 500 ml Wasser resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 20 ml Wasser aufgenommen. Nach Abschluß des letzten Zentrifugationschrittes („Labofuge“ 800 g, 15 min) wurden die Zellen in 2 ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert, portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so gewonnenen Portionen wurden bei -80°C gelagert.

Die Transformationsrate wurde durch Transformation von 0,1 ng ungeschnittener Plasmid-DNA bestimmt und sollte größer als 10⁸ Zellen/µg DNA sein.

2.1.7 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Zur Transformation wurden 40 µl kompetente Zellen mit 10 µl Ligationsansatz vermischt, 1 min auf Eis inkubiert und in eine eisgekühlten Elektroporationsküvette gegeben. Nach Gabe eines Elektropulses (1350 V, 5 ms) wurden die Zellen sofort mit 1 ml LB-Medium in ein Reagenzglas überführt und für 45 min bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen auf LB-Agarplatten, die die entsprechenden Antibiotika zur Selektion der Transformanten enthalten, ausplattiert und 12-16 h bei 37°C zur Ausbildung der Kolonien inkubiert.

In dieser Arbeit wurden der *E.coli* Stamm M15/pDMI.1^[45] zur Transformation und späteren Proteinexpression eingesetzt.

2.1.8 Glycerindauerkulturen von Bakterien

300 µl 50%iges, autoklaviertes Glycerin wurden mit 700 µl einer Bakterienkultur ($OD_{600nm} = 0,7$) in einem Dauerkulturgefäß vermischt und bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

2.1.9 Plasmidisolierung aus Bakterien im kleinen Maßstab

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das Verfahren der alkalischen Lyse verwendet. Hierbei werden die Bakterien durch Lysozym aufgeschlossen. Die Abtrennung der Plasmid-DNA von der übrigen Zell-DNA wird durch selektive Denaturierung der chromosomalen DNA erreicht, wobei die gesamte Zell-DNA in alkalisches Milieu gebracht wird. Durch Neutralisation der Lösung renaturieren dann selektiv nur kleiner DNA-Fragmente, wie z.B. Plasmiden. Die chromosomale DNA fällt in Form eines unlöslichen Aggregats aus und kann zusammen mit den mit SDS beladenen Proteinen, die als Kaliumsalze ausfallen, durch Zentrifugation abgetrennt werden. Der aus der Zentrifugation gewonnene Überstand enthält die Plasmid-DNA und ebenfalls renaturierte RNAs.

Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Impföse einzeln von LB-Agarplatten in je 1,5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium überimpft und über Nacht bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Die Zellen wurden dann für 30 s bei 10.000 g pelletiert und in 100 µl Lösung I auf Eis resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation wurde der Zellaufschluß durch Zugabe von 200 µl Lösung II vervollständigt und die DNA denaturiert. Bakterielle DNA sowie SDS-Proteinkomplexe wurden mit 150 µl Lösung III 10 min auf Eis präzipitiert und anschließend durch Zentrifugation bei 10.000 g für 30 min pelletiert.

Da der Anteil der RNA für eine genaue Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA stört, wurde die Methode durch folgende Reinigungsschritte erweitert. Das getrocknete Nukleinsäure-Pellet wurde in 50 µl TE-RNase-Puffer (20 µg/ml RNase A und 500 Einheiten/ml RNase T1) gelöst und 1 h bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl 10 M NH_4OAc wurde die DNA mit 150 µl Ethanol 2 min bei Raumtemperatur gefällt, 2 min bei 10000 g pelletiert und nach dem Trocknen in 10 µl TE-Puffer gelöst. Durch Zusatz von 1 µl 10 M NH_4OAc und 25 µl Ethanol wurde die DNA erneut gefällt. Das Präzipitat wurde in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration der gewonnenen DNA bestimmt.

Lösung I: 25 mM Tris-HCl, pH 7,9
 10 mM EDTA, pH 7,9
 50 mM Glucose
 Lysozym

Lösung II: 200 mM NaOH
1% SDS

Lösung III: 5 M KOAc
11,5% HOAc

2.1.10 Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab

100 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) wurden mit 0,5 ml einer 6 h Kultur rekombinanter Bakterien angeimpft. Nach 12 h Inkubation im Warmluftschüttler bei 37°C wurden die Bakterien sedimentiert (15 min, 6000 g, GSA-Rotor, Raumtemperatur) und die Plasmid-DNA mit dem DNA-Reinigungs-System (*'DNA-Purification System'*; Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde anschließend durch Messung der OD_{260nm} bestimmt.

2.1.11 TBE-Agarosegele

Die Elektrophorese in Agarosegelen erfolgte in horizontalen Gelkammern bei 90 V. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit Agarose-Konzentrationen von 0,7% - 1,5% (w/v) hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose mit TBE-Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt und in die Gießform gegeben, wo sich das Gel durch Abkühlen auf Raumtemperatur bildet. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TBE-Puffer verwendet. Als DNA-Größenstandard diente ein 1 kb Leiter-Standard (GibcoBRL).

2.1.12 *In vitro* Mutagenese mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)

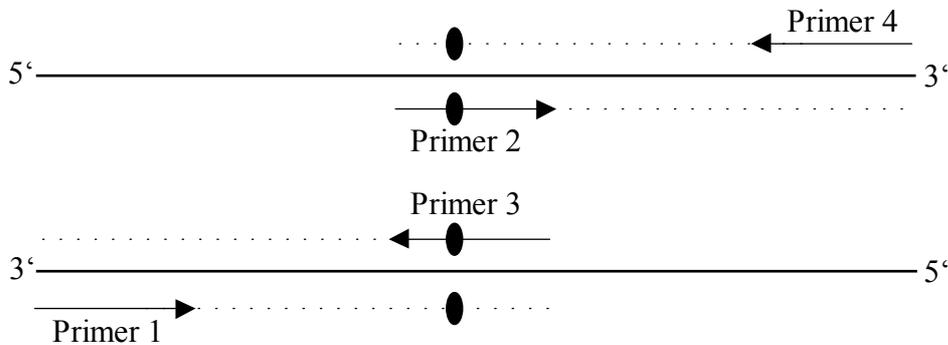
Zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe der überlappenden PCR

Diese Mutagenese-Technik lehnt sich an das von Ho et al.^[46] sowie Herlitz und Koen^[47] entwickelte Verfahren an. Mit dieser Methode können unabhängig von vorhandenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme an jeder beliebigen Position des Gens eine oder mehrere Mutationen erzeugt werden. Hierzu wurden bei diesem Verfahren drei PCR-Reaktionen mit insgesamt vier verschiedenen Primern durchgeführt. In Abbildung 2.1.11-1 ist das Prinzip dieser Technik dargestellt. Für die erfolgreiche Verwendung dieser Methode war es notwendig, daß sich zwischen Primer 1 und Primer 2 sowie zwischen Primer 3 und Primer 4, des zu mutierenden DNA-Doppelstrangs, jeweils eine Restriktionsschnittstelle befindet. Desweiteren muß ein äußerer Primer (Nr.1) komplementär zum codierenden Strang, der andere, Nr. 4, komplementär zum Gegenstrang des zu mutierenden DNA-Doppelstrangs sein.

Die beiden mittleren Primer, Nr. 2 und 3, trugen die Mutation und führten diese in die DNA-Sequenz ein.

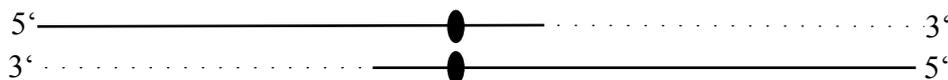
Die Mutationen wurden in die Plasmide pRT166^[48] und p6HRT51^[49] eingeführt.

A)



B)

1) Auffüllen der 3'-Enden der mutierten DNA-Stränge aus A)



2) Amplifikation der doppelsträngigen DNA aus 1)

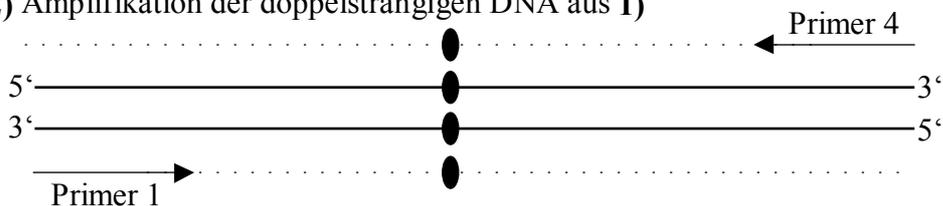


Abbildung 2.1.11-1: Schema der *in vitro* Mutagenese mit Hilfe der überlappenden PCR.

A) PCR-Reaktionen der 1. Runde, **B)** PCR-Reaktionen der 2. Runde (Erläuterungen im Text)

Zu Beginn wurden zwei PCR-Reaktionen, unter den am Ende dieses Abschnittes beschriebenen Bedingungen, parallel ausgeführt. In der ersten Reaktion (vgl. Abbildung 2.1.11-1) wurde die zu mutierende DNA in Anwesenheit von Primer Nr. 1 und 3 vervielfältigt, im zweiten Ansatz fand die Vervielfältigung der zu mutierenden DNA durch die Primer Nr. 2 und 4 statt. Die hieraus resultierenden PCR-Produkte, die nun die gewünschte Mutation trugen und teilweise überlappten, wurden über ein LM-Gel gereinigt. Durch ein Agarosegel wurde die Menge der isolierten Fragmente abgeschätzt. Darauf folgend wurden jeweils 100 fmol der PCR-Produkte zur Hybridisierung in einem Volumen von 15 μ l in TE-Puffer bei 95°C denaturiert, anschließend 5 min bei 37°C inkubiert und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die nachfolgende PCR-Reaktion wurden 2 μ l (13 fmol) des

Hybridisierungsansatzes eingesetzt. Während dieser Reaktion füllte die Pfu Polymerase zunächst die 3'-Enden der hybridisierten DNA-Stränge auf, bevor durch Zugabe der Primer Nr. 1 und 4 die Amplifikation des gesamten DNA-Fragments gestartet wurde. Das Reaktionsprodukt dieser PCR-Reaktion wurde dann über ein LM-Agarosegel gereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in den gewünschten Vektor ligiert. Das Vorhandensein der eingeführten Mutationen wurde durch Sequenzierung des entsprechenden Abschnitts des erhaltenen Vektors bestätigt.

PCR-Ansätze und -Zyklen:

Für einen 50 µl PCR-Ansatz (1. Runde, Abbildung 2.1.11-1 A) wird verwendet:

1 fmol	DNA-Matrize (Endkonzentration 2 pM)
2 µl	15 µM Primer 1 (Endkonzentration 0,6 µM)
2 µl	15 µM Primer 2 (Endkonzentration 0,6 µM)
1 µl	10 mM dNTP's (Endkonzentration 0,2 mM)
5 µl	10 x Reaktionspuffer
1 U	Pfu Polymerase
ad 50 µl H ₂ O	

Für die zweite PCR-Runde (entspricht Abbildung 2.1.11-1 B) wurde folgender Ansatz gewählt:

2 µl	des o.g. Hybridisierungsansatzes (13 fmol) aus der ersten PCR-Runde
2 µl	15 µM Primer 1
2 µl	15 µM Primer 4
5 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl	10 mM dNTPs
1U	Pfu Polymerase
ad 50 µl H ₂ O	

Ein typisches PCR-Protokoll sah wie folgt aus, wobei in Abhängigkeit von der Länge und der Sequenz der verwendeten Primer die Hybridisierungstemperatur variiert wurde.

Denaturierung:	3 min bei 95°C
Hybridisierung:	1 min bei 46°C
Polymerisation:	2 min bei 72°C

Der Zyklus wurde 20 mal wiederholt.

2.1.13 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse der mutierten und klonierten DNA-Fragmente wurde der „*PRISMTM Ready Reaction DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit*“ (Perkin Elmer) verwendet. Dieses System basiert auf einer modifizierten Methode der Sequenzierung nach Sanger et al.

^[50]. Hierbei wird das Prinzip der selektiven Termination der Synthese von DNA-Fragmenten durch zufälligen Einbau von Didesoxynukleotiden verwendet. Jedes der vier Didesoxynukleotide trägt einen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, durch den es identifiziert werden kann. Der Einsatz einer thermostabilen Polymerase und die vier unterschiedlich markierten dNTPs ermöglichen, daß die Reaktion, ähnlich wie eine PCR-Reaktion in nur einem Reaktionsgefäß durchgeführt wird.

Für eine Sequenzierung (20 µl Ansatz) wurden 1 µg Plasmid-DNA, 3 pmol Primer und 8 µl Terminator-Mix zunächst 1 min bei 95°C inkubiert und durchliefen danach folgendem Reaktionszyklus 25 mal:

30 s	Denaturierung	95°C
1 min	Hybridisierung	46°C
4 min	Polymerisation	60°C

Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt, zentrifugiert und das Pellet getrocknet. Durch Zugabe von 4 µl deionisiertem Formamid (8,3 mM EDTA, pH 8,0) wurde das Pellet wieder gelöst. Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „ABI Model 373 DNA Sequencers“ (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) analysiert. Dazu wurden die Fragmente durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Am Ende des Gels wurde die Fluoreszenzintensität der unterschiedlich gefärbten Banden bestimmt. Aus der Verteilung der Intensitäten der vier Farbstoffe wurde dann die Sequenz ermittelt. Die Gelelektrophorese wurde im Haus von der Zentralen Einheit „Sequenzierung und Synthese“ durchgeführt.

2.1.14 Induktion der Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

10 µl Glycerindauerkultur (vgl. 2.1.7) der gewünschten Bakterien wurden in 10 ml LB-Medium (100µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) überimpft und 14 h (Übernachtskultur) bei 37°C geschüttelt. Im analytischen Maßstab wurden 10 µl dieser Kultur in 20 ml frisches Medium überimpft und unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 - 0,8 inkubiert. Die Expression des unter der Kontrolle des Lac-Repressors stehenden Gens wurde dann durch Zugabe von 100 µg/ml IPTG für 3 h induziert. Zur Kontrolle der Expression wurden 1 ml Aliquots der Kultur nach 1h, 2h und 3h entnommen und die Zellen für eine Analyse durch SDS-PAGE nach Sedimentation in 100 µl Auftragspuffer aufgenommen. Für präparative Zwecke wurden aus der Übernachtskultur 100 ml Zwischenkulturen angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 4 wachsen gelassen. Je 6 ml dieser Zwischenkulturen wurden dann in 700 ml LB-Medium überimpft und die Induktion wie oben erläutert durchgeführt. Nach Ende der Induktion wurden die Zellen 15 min (4500 g, 4°C) zentrifugiert und der Überstand

verworfen. Das Pellet wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Überprüfung der Induktion wurden $10\ \mu\text{l}$ der abgenommenen Aliquots durch SDS-PAGE analysiert.

Aus $10\ \text{l}$ Expressionskultur konnten so typischerweise $30\ \text{g}$ Zellen gewonnen werden.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Denaturierende SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zum Nachweis von Proteinen und zur Bestimmung deren Reinheitsgrades wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Während der Elektrophorese wandern die denaturierten Proteine im elektrischen Feld durch eine Polyacrylamidmatrix und werden ihrer Größe nach aufgetrennt. Kleine Proteine wandern schneller als große. Nach der Elektrophorese werden die Proteine mit Coomassie-Blue angefärbt.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Elektrophoresegele zu Proteinanalyse sind denaturierende SDS- Polyacrylamidgele mit einem Acrylamidgehalt von 10% (v/v).

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden zuerst die Komponenten für das Trenngel zusammengegeben und die Lösung zwischen zwei Glasscheiben mit einem Zwischenraum von $0,7\ \text{mm}$ gefüllt. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Komponenten für das Sammelgel zusammengegeben und zwischen die Glasplatten über das Trenngel gefüllt und ein Kamm eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Blue angefärbt.

Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele:

Trenngel:	2,5 ml Trenngelpuffer
	1,15 ml H_2O
	1,25 ml 40%ige Acrylamid/Bis-acrylamid-Lösung
	25 μl 10%ige APS-Lösung
	5 μl TEMED
Sammelgel:	1,25 ml Sammelgelpuffer
	960 μl H_2O
	250 μl 40%ige Acrylamid/Bis-acrylamid-Lösung
	12,5 μl 10%ige APS-Lösung
	2,5 μl TEMED

2.2.2 Reinigung von Mutanten der Reversen Transkriptase von HIV-1

Zur Herstellung heterodimerer RT-Mutanten wurden die RT-Untereinheiten p66 und p51 getrennt in *E.coli* exprimiert und die *E.coli*-Zellen anschließend zusammen lysiert und das daraus resultierende heterodimere Protein gereinigt. Da die Expression des p66-Proteins viel geringere Mengen Protein lieferte als die Expression des p51-Proteins mußten stark unterschiedliche Mengen Biomasse der entsprechenden *E.coli*-Kulturen eingesetzt werden (s.u.).

75 g Biomasse von *E.coli*-Kulturen, die das p66-Protein exprimierten und 5 g Biomasse von *E.coli*-Kulturen die das p51-Protein exprimierten wurden in 200 ml A78 Puffer bei 4°C resuspendiert und dann mit Hilfe eines „Microfluidizers“ aufgeschlossen. Hierbei wurden die Zellen mit hohem Druck durch eine kleine Düse gedrückt, wodurch die Zellwand zerstört wurde. Nach anschließender Zentrifugation bei 46000 g (30 min, 4°C) wurde der Überstand mit MgCl₂ auf eine Endkonzentration von 1mM MgCl₂ versetzt, das Pellet wurde verworfen. Zur Dimerisierung der Untereinheiten wurde diese Lösung 12 h bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Lösung bei 4°C mit 1 ml/min auf eine 6 ml Ni-NTA-Superflow-Säule aufgetragen. Die His-Verlängerung am N-Terminus der p51-Untereinheit ermöglichte eine effiziente Reinigung des Proteins durch eine Ni-NTA-Superflow-Säule, da die Histidine spezifisch an das Säulenmaterial binden. Durch Imidazol, das in Konkurrenz zu den Histidinen tritt, konnte das Protein eluiert werden. Anschließend wurde zuerst mit 50 ml A78 Puffer und danach mit 50 ml A78 Puffer gewaschen (5 mM Imidazol) und dann das Protein mit einem Imidazolgradienten eluiert (Basispuffer A78) (vgl. Abbildung 2.2.2-1).

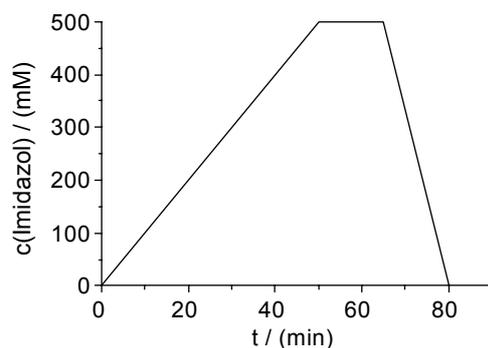


Abbildung 2.2.2-1: Profil des Imidazolgradienten (Basispuffer A78) zur Elution des Proteins von der Ni-NTA-Säule.

Durch eine SDS PAGE wurde analysiert, welche Fraktionen RT enthalten. Diese Fraktionen wurden vereinigt und 12 h gegen 2 l RT-D-10 Puffer dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde über eine 15 ml DEAE-Sepharose „Fast-Flow-Säule“ (Pharmacia Biotech, Schweden)

gegeben und anschließend auf eine „*Hi-Trap Sp*“ Kationentauscher-Säule (Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die Elution des Proteins erfolgte mit einem NaCl-Gradienten (Basispuffer RT-D-10). Die Fraktionen, in denen das Protein enthalten war, wurden durch eine SDS PAGE ermittelt, vereinigt und durch Ultrafiltration mit einer UH 100/25 Ultrahülse (Schleicher & Schuell, Dassel) gegen RT-D-10 Puffer bei 4°C auf eine Konzentration von typischerweise 200 µM eingengt. Nach Zentrifugation der konzentrierten Lösung wurde der Überstand aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

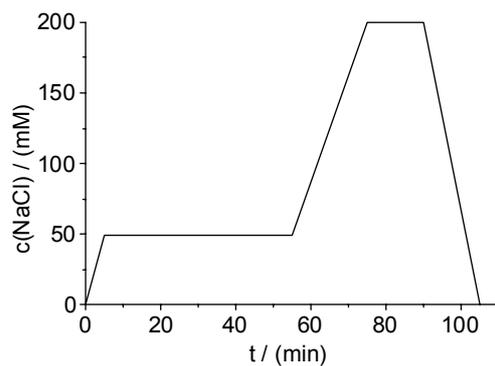


Abbildung 2.2.2-2: Profil eines NaCl-Gradient zur Elution des Proteins (25 mM NaCl, 1mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, 50 mM Tris-HCl, pH 7).

2.2.3 Farbstoffkopplung an Cysteinreste von RT-Mutanten mit einem freien Cystein

Alle in dieser Arbeit gezeigten Fluoreszenzmessungen mit Reverser Transkriptase wurden mit Alexa Fluor® 488 markiertem Protein durchgeführt. Im Folgenden wird die Farbstoffkopplung beispielhaft erläutert. In einem Volumen von 300 µl wurden 26 µM RT und 138µM Alexa Fluor® 488 C5-maleimid (gelöst in DMSO, Abbildung 2.2.3-1, Molecular Probes) für 2 Stunden bei 4°C unter Lichtausschluß auf einem Vortexgerät auf niedrigster Stufe geschüttelt (Puffer: 300 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1,6% Glycerin , 4mM NaCl, maximal 1% DMSO). Anschließend wurde überschüssigen Farbstoff über eine mit RT-D-10 Puffer equilibrierte Gelfiltrationssäule (Nap-5, Pharmacia, Freiburg) abgetrennt und das Eluat auf eine mit A78 (250 mM NaCl) equilibrierte 1 ml Ni-NTA-Superflow-Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen A78 (250 mM NaCl) gewaschen und das modifizierte Protein mit A78 (250 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Das Eluat wurde mit einem „*Biomax 5 Ultrafree-Zentrifugationsfilter*“ in RT-D-10 umgepuffert, auf eine Konzentration von 50µM - 200µM aufkonzentriert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

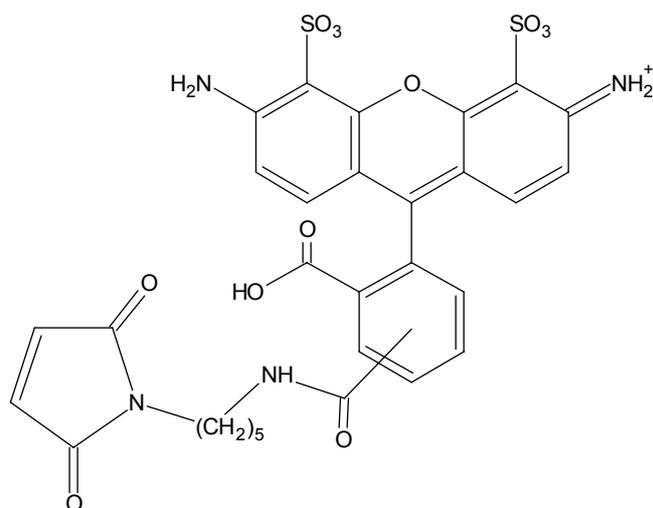


Abbildung 2.2.3-1: Strukturformel von Alexa Fluor[®] 488 C5-maleimid.

2.2.4 Kopplung von Nitroxid-Spinsonden an Cysteinreste von RT-Mutanten mit einem oder zwei freien Cysteinresten

In dieser Arbeit wurde die MTSL-¹⁵N-d₁₅-Nitroxid-Spinsonde (Abbildung 2.2.4-1, Toronto Chemicals Inc., Canada) zur Spinmarkierung von Cysteinen der Reversen Transkriptase verwendet. Um die Zugänglichkeit der Cysteine in den Daumen- und Finger-Domänen von p66 zu erhöhen und bei Mutanten mit zwei freien Cysteinresten evtl. entstandene Disulfidbrücken aufzubrechen wurden die RT-Lösungen vor der Kopplungsreaktion mit DTT versetzt und das Protein anschließend mit einem 18/36mer p/t komplexiert. Die Einzelschritte der Kopplungsreaktion ergaben sich demnach für die Markierung einer RT mit zwei freien Cysteinresten wie folgt.

In einem Volumen von 200 µl wurden 43,5 µM RT und 10 mM DTT für 30 min bei 4°C inkubiert (Puffer: 25 mM Tris-HCl, pH 7, 10% Glycerin, 25mM NaCl). Danach wurde die Lösung mit 16nmol 18/36mer DNA/DNA versetzt und die Mischung weitere 10 min inkubiert. Anschließend wurde das DTT über eine mit RT-D-10 Puffer (300 mM Tris-HCl, pH 7) equilibrierte Nap-5-Säule abgetrennt, wobei das Eluat (850 µl) in 2µl einer 100 mM MTSL-¹⁵N-d₁₅-Lösung (gelöst in DMSO) eingetropfte wurde. Das Reaktionsgemisch wurde nun 16 Stunden bei 4°C auf einem Vortexgerät auf niedrigster Stufe geschüttelt. Danach wurden 400 µl A78 hinzugefügt und die Lösung auf eine mit A78 Puffer equilibrierte 1 ml Ni-NTA-Superflow-Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit jeweils 10 Säulenvolumen A78 und A78 (250mM NaCl) gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte dann mit A78 Puffer (250mM NaCl, 250 mM Imidazol). Das Eluat wurde mit einem „*Biomax*

5 Ultrafree-Zentrifugationsfilter“ (Millipore, Erkrath) in RT-D-10 Puffer umgepuffert, auf eine Konzentration von 50µM - 200µM aufkonzentriert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C. gelagert.

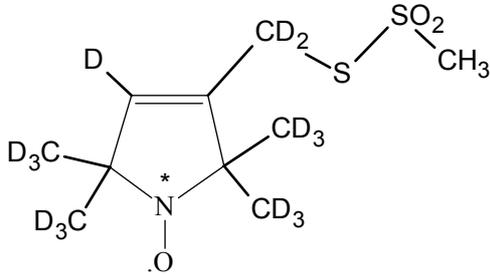


Abbildung 2.2.4-1: Strukturformel der MTSL-¹⁵N-d₁₅-Spinsonde.

* Das ungepaarte Elektron (·) ist zwischen dem Stickstoff- und dem Sauerstoffatom delokalisiert.

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide und Oligodesoxyribonukleotide wurden HPLC- oder PAGE-aufgereinigt von NAPS (Göttingen) oder MWG (Ebersberg) bezogen.

2.3.2 Farbstoff-markierte Oligodesoxynukleotide

Bei 5'-End markierten Oligodesoxynukleotide wurden Cy5-NHS-Ester über eine (CH₂)₆-NH₂-Brücke durch Amid-Bildung gekoppelt. Markierungen innerhalb der Oligodesoxynukleotidsequenz erfolgten direkt an der Base Thymin (T) mit einer (CH₂)₆-Kette über eine Aminobrücke zum C₅ des Pyrimidingerüsts^[51].

2.3.3 Herstellung von DNA/DNA bzw. DNA/RNA Primer/Matrizen

Zur Hybridisierung von Primer- und Matrizenstrang wurden die komplementären Oligodesoxynukleotide in Hybridisierungspuffer gemischt, 2 min auf 90°C erhitzt und im Heizblock über einen Zeitraum von 2 Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt. Um sicher zugehen, daß alle Primermoleküle hybridisiert waren, wurde die Matrize in 10%igem Überschuß eingesetzt. Im Falle der verwendeten fluoreszenzmarkierten Matrizen wurde der komplementäre Primer in 10%igem Überschuß eingesetzt.

2.4 Enzymkinetische Methoden

2.4.1 Pre-Steady-State Fluoreszenzmessungen (Stopped-Flow)

Pre-Steady-State Fluoreszenzmessungen wurden an einem Stopped-Flow Gerät (Abb. 2.4.1-1) der Firma Hi-Tech durchgeführt. Das Gerät war mit einer Hg-Xe-Lampe und einem Fluoreszenzdetektor ausgerüstet.

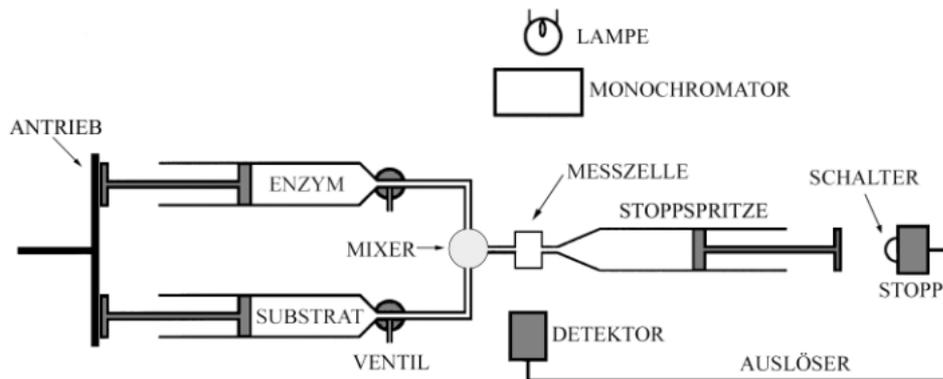


Abbildung 2.4.1-1: Schematischer Aufbau eines Stopped-Flow Gerätes.

Dieses Gerätes ermöglichte Fluoreszenzmessungen im Millisekundenbereich. Das Prinzip beruhte darauf, daß zwei Reaktanden aus zwei Vorratsspritzen durch Druckluft sehr schnell in eine Mischkammer mit direkt nachfolgender Meßzelle gedrückt wurden und durch eine Stoppspritze gebremst wurden. Die Bewegung der Stoppspritze löste den Start der Signalaufnahme aus. Die hierzu benötigte Zeit (Totzeit) zwischen Mischen der Reaktanden und der Signalaufnahme betrug ca. 2 ms. Reaktionen mit einer Halbwertszeit unter ca. 5 ms konnten daher zeitlich nicht aufgelöst werden. Das Reaktionsvolumen wurde durch das Volumen der Stoppspritze bestimmt und betrug bei den in dieser Arbeit gezeigten Messungen ~100 µl.

Die Anregung der Probe erfolgte mit der Hg-Xe-Lampe, deren Spektrum durch einen Monochromator nm-genau begrenzt werden war. Das emittierte Licht wurde durch einen Kantenfilter gemessen, um Anregungstreulicht im Fluoreszenzlicht zu filtern .

In dieser Arbeit wurde die Stopped-Flow Methode zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von RT-Primer/Matrize Komplexen benutzt. Das Fluoreszenzsignal wurde hierbei durch das FRET-Farbstoff-Paar Alexa488/Cy5 generiert. Als Emissionsfilter wurde der Kantenfilter OG520 benutzt , so daß die gemessene Fluoreszenz im wesentlichen vom Alexa488 ausging. Die Anregung des Alexa488 erfolgte bei 435nm.

Die Aufzeichnung der Daten wurde mit dem Programm „RKBIN“ (Hi-Tech), die Auswertung mit dem Programm „Grafit“ (Erithacus Software Ltd.) durchgeführt. Für die Messungen verwendete Puffer wurden zuvor filtriert und entgast.

2.4.2 Gleichgewichts-Fluoreszenz-Messungen (Steady-State Ensemble-Messungen)

Alle Fluoreszenzmessungen wurden mit einem „AB2 Spektrofluorimeter“ (Sopra) mit temperierbarem Küvettenblock in einer 0,7 ml Quarzglasküvette durchgeführt. Die Absorptions- und Emissionsmaxima der in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore sind in Tabelle 2.4.2-1 aufgeführt. Um das Signal/Rauschverhältnis zu minimieren erfolgte die Anregung bzw. Emission der Fluoreszenz bei den aufgeführten Maxima.

Tabelle 2.4.2-1: Extinktions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

	$\lambda_{\text{ex}} / (\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}} / (\text{nm})$
Alexa488	496	519
Cy5	646	667

2.4.2.1 Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung von Dissoziationsgleichgewichtskonstanten und Dissoziationskonstanten von RT-Primer/Matrize Komplexen

Änderungen der Polarität, der Dielektrizitätskonstanten oder der Polarisierbarkeit der Umgebung eines Fluorophors, bewirken eine Verschiebung des Emissionsmaximums λ_{max} und eine Intensitätsänderung der Fluoreszenz. Letzteres konnte ausgenutzt werden um das Gleichgewicht der Bindung von RT an einen Primer/Matrize Komplex und die Dissoziationskonstanten von RT-Primer/Matrize Komplexen zu ermitteln. Hierzu wurde die Primer/Matrize und/oder die Reverse Transkriptase mit einem Fluorophor markiert und die Änderung der Fluoreszenz betrachtet, die sich aus der Bindung der Primer/Matrize an die RT ergibt.

2.4.2.1.1 Titrationsen

In Titrationsexperimenten wurden grundsätzlich 30 nM Lösungen, z.B. der FAM-markierten Primer/Matrize vorgelegt und diese dann mit steigenden Konzentrationen, z.B. Wildtyp RT titriert. Nach jeder Zugabe wurde die Gleichgewichtseinstellung abgewartet und dann die dazugehörige Fluoreszenzintensität notiert.

2.4.2.1.2 Bestimmung von Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (k_D)

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten k_D des RT-Primer/Matrize Komplexes wurden die Titrationsdaten mit dem Programm „*Grafit*“ ausgewertet. Folgende Die Titrationsdaten wurden an folgende Gleichung mathematisch angepaßt:

$$F = F_{\max} - \frac{\{(F_{\max} - F_{\min}) \cdot [(E_0 + P_M + k_D) - \sqrt{(E_0 + P_M + k_D)^2 - 4E_0P_M}]\}}{2E_0} \quad (2.4.2.1.2-1)$$

F ist die relative Fluoreszenzintensität, F_{\max} die relative Fluoreszenzintensität zu Beginn der Titration, F_{\min} die relative Fluoreszenzintensität im Sättigungsbereich, P_M die Endkonzentration der Primer/Matrize und E_0 die Konzentration an Reverser Transkriptase. Alle Konzentrationen und gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf das zu einem Meßpunkt gehörende Gesamtvolumen in der Küvette korrigiert. Zur Kurvenanpassung wurden F_{\max} , F_{\min} und k_D frei variiert.

2.4.2.1.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten (k_{off}) von RT-Primer/Matrize Komplexen

In Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Dissoziation eines RT-Primer/Matrize Komplexes konnten die Dissoziationskonstanten durch eine Ensemble-Messung in einem Fluoreszenzspektrometer ermittelt werden ($k_{\text{off}} < 0,01 \text{ s}^{-1}$). Bei schnellerer Dissoziation wurden die Dissoziationskonstanten in einem Stopped-Flow Gerät ermittelt (vgl. 2.4.2).

Beide Methoden haben gemeinsam, daß eine fluoreszenzmarkierte Primer/Matrize durch Zugabe eines großen Überschusses (100-fach) einer unmarkierten Nukleinsäure aus dem RT-Primer/Matrize Komplex verdrängt wird. Die daraus resultierende Fluoreszenzänderung konnte zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten verwendet werden. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden durch das Programm „*Grafit*“ an folgende zweifach exponentielle Gleichung angepaßt:

$$F(t) = A_01 \cdot e^{-k_{\text{off}1} \cdot t} + A_02 \cdot e^{-k_{\text{off}2} \cdot t} + \text{off},$$

hierbei war F die relative Fluoreszenzintensität, A_01 und A_02 die Amplituden der ersten und zweiten exponentiellen Phase, $k_{\text{off}1}$ bzw. $k_{\text{off}2}$ die Dissoziationskonstanten für die erste bzw. zweite Phase und off die Fluoreszenz am Ende der Messung. Zur bestmöglichen Kurvenanpassung wurden A_01 , A_02 , $k_{\text{off}1}$, $k_{\text{off}2}$ und off frei variiert.

Die in dieser Arbeit gezeigten Dissoziationskonstanten wurden für den Komplex bestehend aus p66^(C38S,C280S)/6H-p51^(C280S/K281C-Alexa488) und 2HMI16/36Cy5-3' durch Verdrängung mit der Primer/Matrize Flo1/Flo4 (Flo1+4) bestimmt.

Speziell wurde der Einfluß des nicht-nukleosidischen RT-Inhibitors BI-RG 587 und der Salzkonzentration im Meßpuffer (Basis-Puffer: RT-salt) auf die Dissoziationskonstanten untersucht. Hierzu wurde vor der Verdrängung der Nukleinsäure aus dem Komplex 200 nM BI-RG 587 zum RT-Primer/Matrize Komplex gegeben und/oder die KCl-Konzentration im Basispuffer zwischen 10 und 80 mM variiert. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

2.4.3 Bestimmung der RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität

Zur Bestimmung der RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität von HIV-1 Wildtyp RT und RT-Mutanten wurde der Einbau von [³H]-markiertem dTTP in eine poly(rA)/oligo(dT)₁₂₋₁₈ bestimmt. Unmarkiertes dTTP und [³H]-markiertes dTTP wurden im Verhältnis 1:65 eingesetzt. Da der Einbau von [³H]-dTTP statistisch erfolgte, konnte zur Auswertung die Menge an [³H]-dTTP der Gesamtmenge an eingesetztem dTTP gleichgesetzt werden. Zur Durchführung des Aktivitätstests wurde man wie folgt vorgegangen.

Eine Lösung bestehend aus 0,2 U/ml poly(rA)/oligo(dT)₁₂₋₁₈, 50 µM dTTP, 8,3 pM ($\hat{=}$ 2,1 µCi/ml) [Methyl-³H]-dTTP (ICN Pharmaceuticals, USA) wird hergestellt. 25 µl dieser Lösung wurden mit 5 µl RT-Lösung (21 nM) versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden je 6 µl der Reaktionslösung auf zwei ~2 cm² große Stücke DEAE-Papier („DE81“, Whatman, England) gegeben und diese vollständig getrocknet. Anschließend wurden die Papierstreifen zweimal in 100 ml 2xSSC Puffer (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat) und einmal in 50 ml abs. Ethanol gewaschen. Zur Ermittlung eines Minimal- und eines Maximalwertes wurde genauso verfahren, aber anstatt RT-Lösung RT-D-10 Puffer verwendet. Der Papierstreifen für den Maximalwert wurde nicht gewaschen. Nach vollständigem Trocknen wurden die Papierstreifen zusammen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit („OptiPhase HiSafe“, Whatman) in ein Szintillationsgefäß überführt und 60 s in einem Szintillationszähler (Wallac 1409) ausgezählt.

2.5 Biophysikalische Methoden

2.5.1 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie lassen sich paramagnetische Substanzen untersuchen. Moleküle sind paramagnetisch (Radikale), wenn sie eine ungerade Anzahl von Elektronen besitzen. In biologischen Systemen existieren paramagnetische Spezies in verschiedenen Formen, beispielsweise als Übergangsmetallkomplexe (mit z.B. Cu^{2+} , Fe^{3+} oder Mn^{2+}), als Folgeprodukte von lichtinduzierten Reaktionen (z.B. bei der Photosynthese), oder als Zwischenprodukte bei Elektronentransferreaktionen. Verfügt das zu untersuchende System (z.B. ein Protein) selbst nicht über ungepaarte Elektronen, oder sind diese nicht geeignet, um eine gegebene Fragestellungen zu untersuchen, können Spinsonden gezielt an bestimmte Positionen in das Protein eingeführt werden (vgl. 2.2.5). Spinsonden sind stabile organische Radikale, häufig verwendet werden Nitroxid-Radikale, wie TEMPO- oder MTS-Spinsonden (s.u.).

Intermediär auftretende Radikale sind oft sehr reaktiv und daher nur kurzlebig, so daß man die Untersuchungen dann meist bei tieferen Temperaturen durchführen muß, bei denen die Radikale langlebiger sind. Alternativ können kurzlebige Radikale zur Quantifizierung durch sogenannte Radikalfallen konserviert werden und stehen damit einer Analyse zur Verfügung.

2.5.1.1 Allgemeine Grundlagen der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Ungepaarte Elektronen eines Atoms besitzen einen Bahndrehimpuls \vec{L} und einen Eigendrehimpuls (Spin) \vec{S} . Der Gesamtdrehimpuls \vec{J} setzt sich additiv aus dem Bahndrehimpuls und dem Eigendrehimpuls zusammen:

$$\vec{J} = \vec{L} + \vec{S} \quad (1) \quad \text{mit}$$

$$|\vec{J}| = \sqrt{J(J+1)}\hbar, \quad (J = \text{Gesamtdrehimpulsquantenzahl})$$

$$|\vec{L}| = \sqrt{L(L+1)}\hbar, \quad (L = \text{Gesamtbahndrehimpulsquantenzahl})$$

$$|\vec{S}| = \sqrt{S(S+1)}\hbar, \quad (S = \text{Gesamtspinquantenzahl})$$

Die Bewegung des Elektrons ruft ein magnetisches Moment hervor, das sich aus den Anteilen des Bahn- und Eigendrehimpulses zusammensetzt:

$$\vec{\mu}_J = \vec{\mu}_L + \vec{\mu}_S \quad (2)$$

Das magnetische Moment ergibt sich aus dem Drehimpuls \vec{J} zu

$$\vec{\mu}_J = -g \cdot \frac{e}{2m_e} \cdot \vec{J} \quad (3)$$

mit dem Landé-Faktor (**g**-Faktor):

$$g = 1 + \frac{J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)} \quad (4)$$

Man kann das magnetische Moment auch in den Einheiten des BOHRschen Magnetons angeben:

$$\mu_B = \frac{|e|\hbar}{2m_e} = 9,274 \cdot 10^{-24} J \cdot T^{-1} \quad (5)$$

Da in organischen Radikalen der Bahndrehimpulsanteil vernachlässigbar ist, muß hier nur der Spin betrachtet werden ($g = 2,00232$). Für diesen Fall gilt also:

$$|\vec{\mu}_J| = |\vec{\mu}_S| = g\mu_B \sqrt{S(S+1)} \quad (6)$$

Wird ein ungepaartes Elektron in ein äußeres Magnetfeld der Flußdichte \vec{B}_0 gebracht, wechselwirkt es mit dem Magnetfeld und die zuvor räumlich isotrope Verteilung der Elektronenspins hebt sich auf (Zeemann-Effekt). Liegt das \vec{B}_0 -Feld an, gilt für die potentielle Wechselwirkungsenergie

$$E = -\vec{\mu}_S \vec{B}_0 = g\mu_B m_S B_0 \quad (7)$$

Mit $S = \frac{1}{2}$ sind, bezogen auf die \vec{B}_0 -Feldrichtung, nur zwei Spineinstellungen erlaubt. Diese sind durch die magnetische Quantenzahl $m_S = +\frac{1}{2}$ („parallele“ Spinrichtung) und $m_S = -\frac{1}{2}$ („antiparallele“ Spinrichtung) charakterisiert. Allgemein gilt $m_S = S, S-1, \dots, -S$ und es gibt $(2S+1)$ Möglichkeiten der Orientierung des Spins zur \vec{B}_0 -Feldrichtung. Mit $m_S = \pm \frac{1}{2}$ für ein ungepaartes Elektron ergeben sich also zwei Energieniveaus

$E_- = -(\frac{1}{2})g\mu_B B_0$ (unteres Energieniveau) und

$E_+ = +(\frac{1}{2})g\mu_B B_0$ (oberes Energieniveau).

Damit ergibt sich ein Abstand der beiden Niveaus (vgl. Abbildung 2.5.1.1-1) von

$$\Delta E = E_+ - E_- = g\mu_B B_0 \quad (8).$$

Ein Absorptionssignal entsteht also dann, wenn die Energie $\Delta E = g\mu_B B_0$ in Form von elektromagnetischer Strahlung eingestrahlt wird, wodurch eine Anregung der Elektronen vom unteren in das obere Energieniveau erfolgt. Durch Relaxationsvorgänge, vorwiegend die Wechselwirkung der Radikale mit ihrer unmittelbaren Umgebung, wird die BOLTZMANN-Verteilung der Energieniveaus wieder hergestellt.

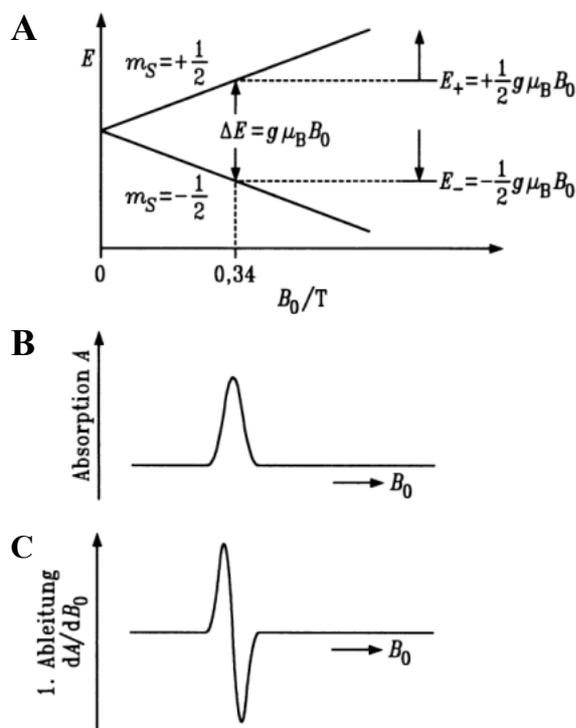


Abbildung 2.5.1.1-1: **A**, Zeemann-Aufspaltung der Energieniveaus eines Elektrons im B_0 -Feld zunehmender Stärke. Bei Einstrahlen einer Mikrowellenfrequenz von 9,5 GHz tritt Absorption der Mikrowellenstrahlung bei 0,34 T ein; **B**, Das Absorptions-ESR-Signal als Funktion des im B_0 -Feldes; **C**, 1. Ableitung (dA/dB_0) des Absorptions-ESR-Signals^[52].

2.5.1.2 Hyperfeinwechselwirkung

Das in Abbildung 2.5.1.1-1 C dargestellte Absorptionssignal zeigt die Wechselwirkung eines einzelnen freien Elektrons mit dem angelegten B_0 -Feld. In einer realen Probe, wie z.B. einem Nitroxid-Radikal, beeinflussen neben dem B_0 -Feld aber noch andere magnetische Felder, wie die intramolekularen Felder anderer Elektronen und des Kerns, das ungepaarte Elektron. Dies führt zu einer Aufspaltung der Energieniveaus des Elektrons. Relevant diesbezüglich ist

jedoch nur das durch den Kernspin erzeugte magnetische Feld. Die durch andere Elektronen erzeugte Felder sind im Vergleich zum B_0 -Feld nur sehr klein, und können daher vernachlässigt werden. Das von den Atomkernen erzeugte lokale Feld addiert sich mit dem B_0 -Feld zu einem effektiven Feld. Durch die Kernspinquantenzahl I haben die Atomkerne $(2I+1)$ Einstellmöglichkeiten zum B_0 -Feld, welche durch ihre m_I -Werte festgelegt sind. Hierdurch spaltet die ESR-Linie $(2nI+1)$ -fach auf (mit n = Anzahl äquivalenter Nachbarkerne). Diese durch den Kernspin hervorgerufene Aufspaltung bezeichnet man als Hyperfeinwechselwirkung. Das Aufspaltungsmuster ist in Abbildung 2.5.1.2-1 exemplarisch für $I = 1$ (z.B. ^{14}N) und $S = \frac{1}{2}$ dargestellt.

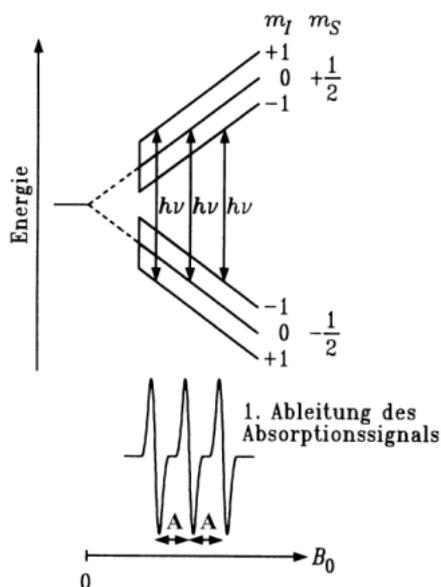


Abbildung 2.5.1.2-1: Hyperfeinaufspaltung (A) durch Wechselwirkung eines ungepaarten Elektrons ($S = \frac{1}{2}$) mit den magnetischen Momenten eines Kernspins ($I = 1$, für ^{14}N -Kern). Die Orientierungen des Kernspins ergeben sich durch $m_I = 1$, $m_I = 0$ und $m_I = -1$. Es gelten folgende Auswahlregeln: $\Delta m_S = \pm 1$ und $\Delta m_I = 0$.

Eine ESR-Linie wird hierbei in drei Linien aufgespalten und die Resonanzbedingung ergibt sich zu

$$B_{\text{res}} = B_0 - A \cdot m_I \quad (9).$$

Die Hyperfeinkopplungskonstante A gibt den Abstand der Hyperfeinlinien im ESR-Spektrum an. B_0 ist die Feldstärke bei der ohne Elektron-Kern-Wechselwirkung Resonanz auftritt. Das Muster der Hyperfeinstruktur eines ESR-Spektrums, also die Anzahl der Linien und deren Intensität, hängt somit von der Anzahl und der Kernspinquantenzahl der benachbarten Kerne

ab, die mit dem Elektronenspin wechselwirken. Für organische Radikale, wie z.B. einem Nitroxid-Radikal, dominiert die Kopplung mit Kernen, die direkt gebunden sind, das Spektrum. Kerne, die eine Bindung weiter entfernt sind, koppeln nur sehr schwach und haben daher kaum Auswirkungen auf das Spektrum. In Abbildung 2.5.1.2-2 sind die Aufspaltungsmuster für kovalent an Proteine gebundene Nitroxid-Radikale mit ^{14}N - und ^{15}N -Kernen gezeigt ($I = 1$ bzw. $\frac{1}{2}$). Das Spektrum der Spinsonde mit ^{15}N weist, im Gegensatz zum ^{14}N -Spektrum (3 Linien), nur zwei Linien auf.

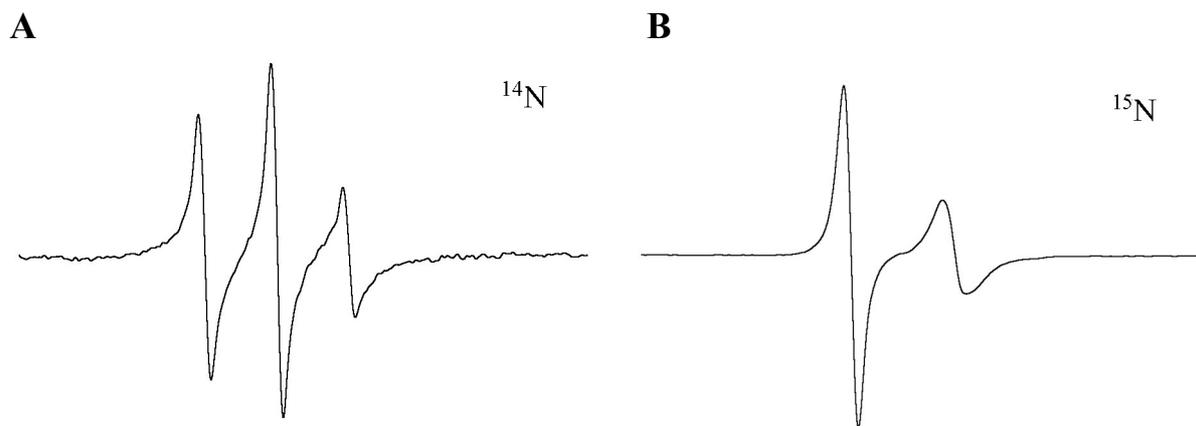


Abbildung 2.5.1.2-2: ESR-Spektren von MTS-Spinsonden gebunden an HIV-1 RT. Die Hyperfeinaufspaltung ist abhängig von der Kernspinquantenzahl: **A**, MTS (^{14}N , $I = 1$); **B**, MTS (^{15}N , $I = \frac{1}{2}$).

2.5.1.3 Anisotropie von A und g / Immobilisierungseffekte

Aus der Geometrie des Nitroxid-Radikals ergibt sich eine ausgeprägte Anisotropie der Hyperfeinaufspaltung (**A**) und des Landé-Faktors (**g**), weswegen beide als Tensoren betrachtet werden. Diese Anisotropie bewirkt, daß das Spektrum der Spinsonde Information über die Korrelationszeit τ_R seiner thermischen Molekularbewegung enthält. Dies sei im folgenden verdeutlicht. Nehmen wir zunächst an, die Spinsonde sei völlig immobil, und in der Probe seien alle möglichen Orientierungen des Nitroxides zum Magnetfeldvektor gleich verteilt vertreten (Abbildung 2.5.1.2-3, unteres Spektrum); das gemessene Spektrum repräsentiert die Summe über die orientierungsabhängigen Spektren aller Nitroxidmoleküle in der Probe. Wegen der starken Anisotropie der Hyperfeinaufspaltung findet man eine breite Verteilung der äußeren Hyperfeinlinien, so daß die spektrale Breite des Spektrums entsprechend groß wird. Die Zentralresonanz erfährt eine Verbreiterung durch die Anisotropie von **g**. In diesem Bereich überlagern sich Linien mit leicht verschobenen Resonanzfrequenzen.

Dementsprechend findet man für ein sogenanntes Pulverspektrum auch eine maximale Linienbreite. Proben, die auf Temperaturen $< 200\text{K}$ abgekühlt werden, zeigen solche Pulverspektren. Im zweiten Grenzfall hat das Nitroxid eine isotrope Rotationsdiffusion und eine kurze Korrelationszeit (Abbildung 2.5.1.2-3 oben). Wenn der Kehrwert der Korrelationszeit groß ist gegenüber der spektralen Aufspaltung der Hyperfeinniveaus, kann letztere nicht mehr aufgelöst werden. Das bedeutet, daß nun zwar die gleiche Winkel- und Elementarspektrenverteilung wie im immobilisierten Fall vorliegt, doch wird diese in einer so kurzen Zeit durchlaufen, daß nur ein isotroper Mittelwert über alle Resonanzen detektiert wird. Man mißt ein Spektrum mit drei diskreten Absorptionslinien minimaler Breite; auch die

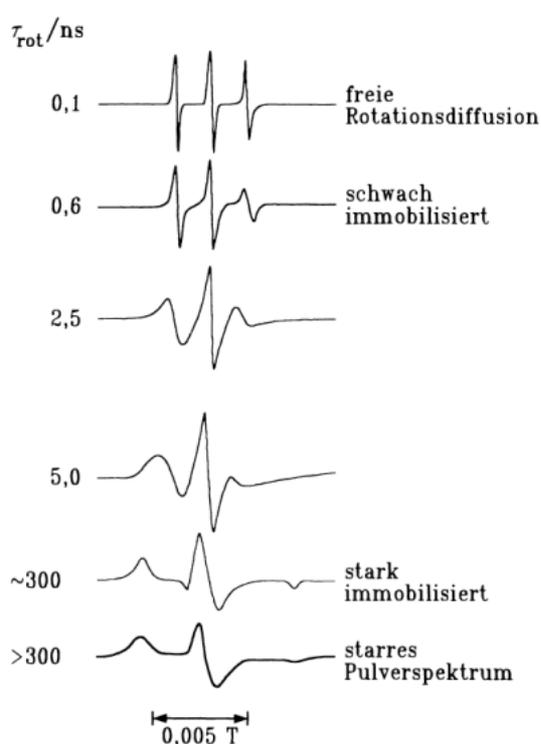


Abbildung 2.5.1.2-3: Abhängigkeit der Linienform eines ESR-Spektrums von der Beweglichkeit/Rotationskorrelationszeit einer kovalent an ein Protein gebundenen Spinsonde^[52].

gesamte spektrale Breite des Spektrums wird minimal. In den dazwischen liegenden Bereichen der Nitroxidmobilität findet man Spektren, deren Gestalt in Form von Linienbreite und zweitem Moment stark von der Mobilität abhängt.

Für die in dieser Arbeit verwendete MTS-Spinsonde wurde gezeigt, daß die Bindungsrotationen des Linkers im gebundenen Zustand ausreichen, um die Anisotropien von \mathbf{g} und \mathbf{A} hinreichend auszumitteln^[53]. Das Spektrum der proteingebundenen Spinsonde wird somit durch die Dynamik der markierten Proteinseitenkette als Funktion ihrer

Wechselwirkung mit der lokalen Proteinumgebung bestimmt. Man hat also eine Sonde, die Information über die Sekundär- und Tertiärstruktur in ihrer unmittelbaren Umgebung liefert.

2.5.1.4 ESR-Spektren Simulation zur Bestimmung von Interspinabständen

In gefrorener Lösung ($T < 200\text{K}$) ist die Beweglichkeit der Aminosäureseitenketten sehr stark eingeschränkt. Die Dynamik des Proteins zeigt in diesem Temperaturbereich ein Glas-ähnliches Verhalten und die Rotationskorrelationszeit der Seitenketten der Spinsonden überschreitet 100ns ^[54]. Es sind nur Vibrationsbewegungen des an das Protein gebundenen Nitroxids mit sehr kleiner Amplitude detektierbar. Die residuale Ausmittelung der g - und Hyperfeinanisotropie verringert die Hyperfeinaufspaltung um weniger als 2%. Daher kann die Linienform der Proteinproben in gefrorener Lösung gut durch ein Pulverspektrum beschrieben werden. Die Linienform eines Pulverspektrums, in dem die räumliche Verteilung der Spinsonden zufällig ist, wird auf der Basis der Eigenwerte des Hamiltonoperators simuliert:

$$H = \beta_e \mathbf{Sg} B_0 + \mathbf{SAI} \quad (2.5.1.4-1)$$

Hierbei ist B_0 der Vektor des externen Magnetfeldes, β_e das BOHRsche Magneton, \mathbf{g} der Tensor des g -Wertes eines Elektrons und \mathbf{A} der Spin-Kern-Wechselwirkungstensor. Die Eigenwerte des Hamiltonoperators können wie folgt dargestellt werden^[55]:

$$\begin{aligned} E &= \beta_e B_0 M_s + \mathbf{A}(\theta, \varphi) M_s M_I \\ \mathbf{g}(\theta, \varphi) &= g_{xx} I_{zx} + g_{yy} I_{zy} + g_{zz} I_{zz} \\ \mathbf{A}(\theta, \varphi) &= (A_{xx}^2 I_{zx} + A_{yy}^2 I_{zy} + A_{zz}^2 I_{zz})^{1/2} \end{aligned} \quad (2.5.1.4-2)$$

mit g_{ii} und A_{ii} als Hauptwerte für die Tensoren \mathbf{g} bzw. \mathbf{A} , I_{zi} als Cosinus-Quadrat der Richtungen der molekularen Achse des Nitroxids i und der Magnetfeld-Richtung z . M_s und M_I sind die Eigenwerte von S_z bzw. I_z . In dem von Steinhoff et al.^[56] entwickelten Algorithmus werden die Position der ESR-Linie durch die Gleichung (2.5.1.4-2) berechnet, mit Schrittweiten von 3° für θ und φ . Die Intensität jeder Absorptionslinie, $I d\Omega$, ist dabei proportional zu der Anzahl der Moleküle, deren z -Achse in den Raumwinkel $d\Omega$ zeigt. Die Intensität für eine gegebene zufällige Verteilung der Orientierung der Nitroxide ergibt sich aus

$$I d\Omega \propto \sin \theta d\theta d\varphi \quad (2.5.1.4-3).$$

Das so erhaltene Strichspektrum wird mit einer Verbreiterungsfunktion gefaltet, die aus der Superposition einer Gaus- und einer Lorenzverteilung besteht. Dadurch wird der natürlichen Linienverbreiterungs-Mechanismus in die Berechnung mit einbezogen. Dabei geht man davon aus, daß die Linienverbreiterung unabhängig von der Orientierung der Spinsonden ist. Durch eine nicht lineare Anpassung mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate werden die eingesetzten Startwerte für \mathbf{g} und \mathbf{A} und die drei Parameter für die Linienbreite (die Breite der Gaus- und der Lorenzfunktion sowie deren Anteile) iterativ variiert, bis das Quadrat der Differenz des gerechneten und des gemessenen Spektrums ein Minimum aufweist^[56].

Dipolare Linienverbreiterung

Die dipolare Wechselwirkung zweier ungepaarter Elektronen führt zu einer deutlichen Linienverbreiterung, wenn Mittellungen durch bewegliche Spinsonden nicht auftreten, wie z.B. in gefrorener Lösung bei $T < 200\text{K}$ (s.o.). Die Absorptionslinien wechselwirkender Spins werden dann um den Betrag ΔB verschoben. ΔB ist gegeben durch

$$\Delta B = \pm \frac{3g\beta_e(3\cos^2\theta - 1)}{4\rho^3} \quad (2.5.1.4-4).$$

Hier ist θ der Winkel zwischen dem magnetischen Feld B_0 und dem Abstandsvektor ρ zwischen den wechselwirkenden Spins. Die resultierende Funktion für die Linienform, $G(B)$, wird mit der Gleichung (2.5.1.4-4), unter Verwendung diskreter Schritte von 3° für θ , berechnet. In einer gefrorenen Lösung kann die Verteilung der Orientierung der Spinsonden als isotrop angenommen werden. Dann berechnet sich die Intensität der Linien für jedes Winkelintervall nach Gleichung (2.5.1.4-3). Um der Verteilung der Interspinabstände in einer realen Probe gerecht zu werden wird eine Gausverteilung für die Abstände mit einem mittleren Abstand \bar{r} und einer Breite von σ angenommen^[37].

2.5.1.5 Aufbau des Elektronenspinresonanz-Spektrometers

Abbildung 2.5.1.5-1 zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten ESR-Anlage. Aus folgenden Komponenten ist ein ESR-Spektrometer grundsätzlich aufgebaut:

- Ein stabiles externes magnetisches Feld, das durch einen Elektromagneten erzeugt wird und über einen Feldbereich variiert werden kann.
- Eine Mikrowellenquelle, meist eine Klystron-Mikrowellenoszillator-Röhre.
- Ein Resonator, in dem sich die Probe befindet.

- Ein Detektor für die Mikrowellenabsorption im Resonanzfall.
- Ein rauschunterdrückendes Verstärkersystem für das Absorptionssignal.
- Eine phasenempfindliche Gleichrichtung, die an eine Modulation des Magnetfeldes gekoppelt ist, um das Signal-Rauschverhältnis zu verbessern.

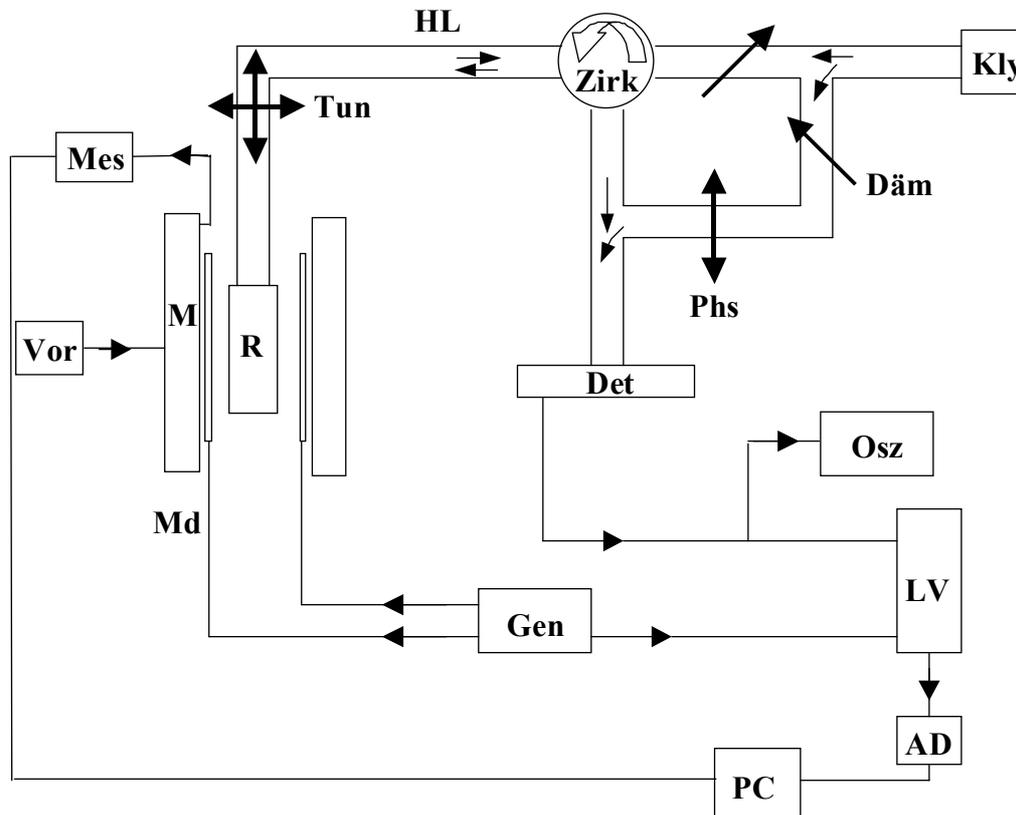


Abbildung 2.5.1.5-1: Schematischer Aufbau der ESR-Anlage. Die einzelnen Komponenten sind wie folgt abgekürzt: AD Analog-Digital-Wandler, Däm Dämpfer zur Regulierung der Leistung, Det Detektordiode, Gen 50kHz-Generator, HL Hohlleiter, Kly Klystron Sender (9 GHz), LV Lock-In-Verstärker (phasenempfindlicher Gleichrichter), M Elektromagnet für das Mikrowellenquelle, Probe und Detektionssystem sind über eine Brückenschaltung verbunden. B_0 -Feld, PC Computer zur Datenaufzeichnung, Phs Phasenschieber, R Hohlraumresonator als Probenraum, Tun Slide-Screw-Tuner, Vor Vorschub, Zir Zirkulator.

Sendet das Klystron im Mikrowellen X-Band, so liegt die Frequenz im Bereich von 9 MHz, was einer Wellenlänge von 3,33 cm entspricht. Das Klystron wird abgestimmt und dann auf die Resonanzfrequenz des Resonators eingestellt. Die Probe befindet sich hierbei im Resonator. Eine automatische Frequenzregelung (AFC) sorgt für eine konstante Klystronfrequenz. Um die in den Resonator eingestrahlte Leistung P_0 variieren zu können, sind in das Mikrowellensystem Abschwächer eingebaut. Die Ausgangsleistung des benutzten Klystrons beträgt ca. 90 mW. Durch geeignete Ankopplung bildet sich im Resonator eine stehende Welle aus. Diese Welle ist linear polarisiert, d.h. aus zwei in der xy-Ebene

entgegengesetzt umlaufenden zirkular polarisierten Wellen zusammengesetzt. Durch den Hohlraumresonator wird das magnetische Wechselfeld B_1 resonanzüberhört.

Das äußere Magnetfeld B_0 definiert die z-Richtung des Laborsystems und steht senkrecht zum B_1 - Feld im Resonator. Die Messung der Flußdichte B_0 dient der magnetfeldsynchronen Aufzeichnung des Spektrums durch den Computer. Die magnetische Flußdichte B_0 wird mit konstanter Änderungsrate erhöht. Die Mikrowellenstrahlung des Klystrons erreicht den Resonator. Der Resonator ist so an das Hohlleitersystem angepaßt, daß durch Dämpfung die gesamte ankommende Energie verbraucht wird, daher tritt keine Reflexion auf. Wird im Resonanzfall allerdings Energie von der Probe im Resonator absorbiert, so wird die Anpassung gestört und ein Teil der Mikrowelle wird reflektiert. Hierbei ist die reflektierte Mikrowellenleistung proportional zur von der Probe absorbierten Mikrowellenleistung. Ein Zirkulator leitet das reflektierte Mikrowellensignal über einen Nachweiszweig zur Diode, einem Kristalldetektor, der eine der Intensität der reflektierten Mikrowelle proportionale Gleichspannung liefert. Um ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu bekommen, wird dem äußeren Magnetfeld B_0 ein richtungsgleiches Magnetfeld durch einen Generator und zusätzliche Spulen aufmoduliert. Der Modulationshub ΔB_H muß kleiner als die Linienbreite des Spektrums sein. Diese Überlagerung bewirkt, daß das tatsächliche Magnetfeld $B(t)$ mit dem Modulationshub ΔB_H um das äußere Magnetfeld $B_0(t)$ schwingt. Somit schwingt im Resonanzfall auch die Absorption des Systems. Die Amplitude dieser Schwingung ist das Maß für die Änderung der Absorption bei Änderung des B_0 -Feldes, also die erste Ableitung der Absorption (Abbildung 2.5.1.5-2). Die nun am Kristalldetektor entstehende Wechselspannung ist ein Maß für die erste Ableitung der Absorption $A(B_0)$. Sie wird auf

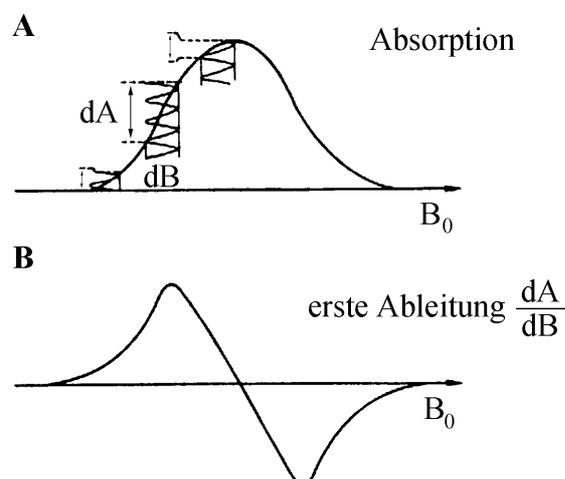


Abbildung 2.5.1.5-2: Die Modulation des externen Magnetfeldes (A) führt zur Aufzeichnung der ersten Ableitung des Absorptionssignals (B).

einem Oszillographen beobachtet und einem Lock-In-Verstärker (Phasengleichrichter) zugeführt. Nach der Gleichrichtung wird das ESR-Signal als erste Ableitung der Absorption beobachtet. Dieses Signal wird mittels eines AD-Wandlers digitalisiert und durch einen Computer aufgezeichnet (Abbildung 2.5.1.5-2).

2.5.1.6 Molekulardynamik-Simulationen

Die Simulationen der Molekulardynamik der Spinsonden-Seitenketten wurde nach der Methode von Steinhoff *et al.* durchgeführt^[37,57].

2.5.1.7 NNRTIs und dsDNA für ESR-Experimente

Für die ESR-Messungen mit den NNRTIs S-TIBO und Nevirapine wurden 50 mM Stocklösungen in DMSO hergestellt, die bei -20°C gelagert wurden. Bei Bedarf wurden diese mit Wasser verdünnt.

In den Messungen mit dsDNA wurde die 18/36mer DNA/DNA Primer/Matrize Flo1/Flo4 (Flo1+4) verwendet.

2.5.1.8 Probenvorbereitung

Alle Proben für die ESR-Spektroskopie wurden in Quarzglasröhrchen vermessen. Das Probenvolumen betrug bei den Messungen in Lösung $7\mu\text{l}$ und bei den Messungen in gefrorener Lösung $30\mu\text{l}$. Die Konzentration der RT in der Meßlösung variierte hierbei zwischen $40\mu\text{M}$ und $70\mu\text{M}$, wobei das molare Verhältnis zwischen RT und Ligand immer 1:2 betrug. Für alle Messungen wurde der Puffer RT-D-10 verwendet, wobei der Pufferanteil in der Meßlösung zwischen 50% und 80% variierte. In vergleichenden Messungen wurden die Konzentrationen von RT und Ligand sowie die Pufferanteile in den Meßlösungen konstant gehalten.

2.5.2. Fluoreszenzspektroskopie

2.5.2.1 Multidimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie durch BIFL

Die in dieser Arbeit verwendete spektroskopische Technik für die Datenaufnahme und -analyse der Fluoreszenz von einzelnen Molekülen wird als BIFL-Methode („Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime“) bezeichnet. Diese Technik wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Claus Seidel am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen

entwickelt. Die folgenden theoretischen Erläuterungen sind in Anlehnung an die Dissertationsschrift von Christian Eggeling verfaßt^[51].

Die Grundidee der BIFL-Technik wurde von Keller et al.^[58] vorgestellt. Eine wirkliche Anwendung auf konkrete Fragestellungen der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie wurde aber erst in der Identifizierung von einzelnen, fluoreszierenden Molekülen^[59-63] und in der zeitlichen Verfolgung von molekularen Konformationsänderungen durch Beobachtung von Fluoreszenzparametern an einzelnen Molekülen gefunden^[64].

Durch die gleichzeitige Aufzeichnung der Informationen über die Fluoreszenzlebensdauer, die Fluoreszenzintensität, die Fluoreszenzanisotropie und den spektralen Bereich jedes einzelnen detektierten Photons, ist es möglich, Prozesse die das Fluoreszenzsignal beeinflussen auf verschiedenste Arten zu analysieren. Insbesondere findet bei diese Art der Datenaufzeichnung keine statistische Mittelung über mehrere Ereignisse oder eine heterogene Probe statt, wie z.B. in der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) oder einer Vielkanalzählerspur, wodurch kein Rohsignal verloren geht. Einen Überblick über mögliche Anwendungsgebiete wurde von Eggeling^[65] vorgestellt, während der prinzipielle elektronische Aufbau von Brand^[59] beschrieben wurde. Im Folgenden werden die BIFL-Technik und die Schritte der Datenanalyse vorgestellt.

2.5.2.1.1 Meßanordnung / Konfokales Mikroskop

Alle Einzelmolekülspektroskopie-Messungen wurden an einem epi-illuminierten konfokalen Mikroskop durchgeführt. In Abbildung 2.5.2.1.1-1 ist der schematische Aufbau dargestellt. Lichtstrahlen von einem oder zwei Lasern werden über einen dichroitischen Strahlteiler in ein Objektiv eingekoppelt und auf die Probe fokussiert. Durch den fokussierten Laserstrahl wird ein offenes Volumenelement definiert, in dem fluoreszenzfähige Probenmoleküle vielfach zur Emission von Fluoreszenzphotonen angeregt werden. Dieses offene Volumenelement stellt gleichzeitig auch das Detektionsvolumen dar. Die Fluoreszenzphotonen werden mit dem selben Objektiv gesammelt, passieren den dichroitischen Spiegel und werden durch die Tubuslinse auf eine Lochblende abgebildet. Hinter dieser Lochblende erfolgt eine Aufweitung des Fluoreszenzlichtes durch eine weitere Linse ($f = 100$ mm), eine Aufspaltung durch einen Polarisationsstrahlteiler in zwei Strahlengänge und eine weitere Aufspaltung dieser beiden Strahlengänge durch zwei weitere dichroitische Farbteiler (DF). Die Abbildung erfolgt durch zusätzliche Linsen ($f = 50$ mm) auf vier Detektoren (D1 bis D4) mit jeweils einem eigenen Fluoreszenzfilter (IF). Das Signal der Detektoren wird in einem Multiplexer vervielfältigt und zu drei verschiedenen, simultan laufenden Meßgeräten weitergeleitet: einem Vielkanalzähler

(„Multichannelscaler“, MCS), einem Hardwarekorrelator (FCS) und der Anordnung zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (BIFL).

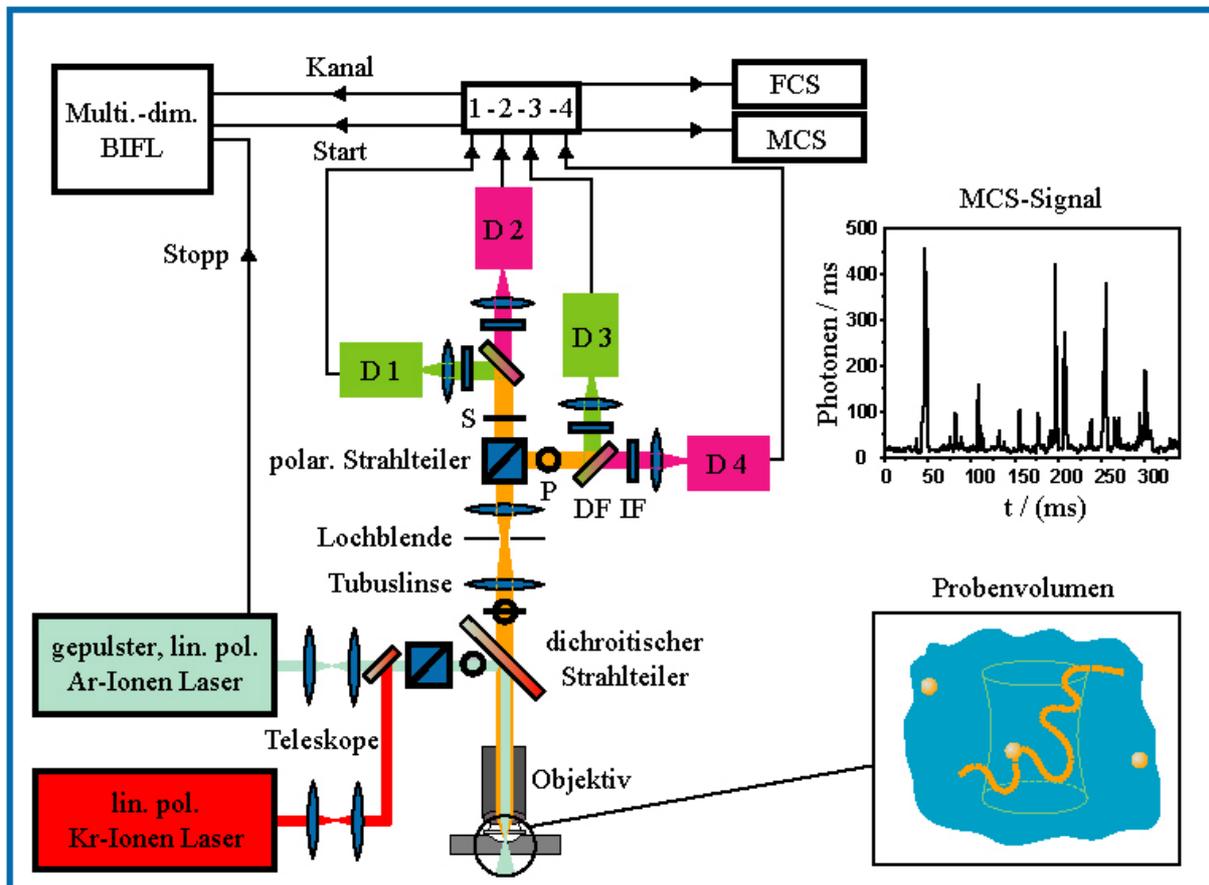


Abbildung 2.5.2.1.1-1: Epi-illuminiertes konfokales Mikroskop (DF: dichroitische Farbteiler, IF: Fluoreszenzfilter, D1 - D4: Detektoren 1 bis 4, nähere Einzelheiten siehe Text).

2.5.2.1.2 Datenaufnahme

Das Prinzip der Datenaufnahme der BIFL-Methode ist in Abbildung 2.5.2.1.2-1 dargestellt. Den regelmäßigen Pulsen (73 MHz) einer Laserlichtquelle (graue senkrechte Linien) als Fluoreszenzanzregung folgt aufgrund der Detektionseffizienz von ca. 2% nur nach einigen dieser Pulse die Detektion von Signalphotonen (kleinere senkrechte Linien)^[51]. Zu jedem detektierten Signalphoton werden vier verschiedene Parameter gespeichert: (1) die zeitliche Detektionsreihenfolge der Photonen in Form der Ereignisnummer, $ev\#$; (2) die Abklingzeit, $\Delta\tau$ (schwarzer waagerechter Balken), als Abstand zwischen dem auslösenden Laserpuls und der Detektion des Photons (zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung, ps- bis ns-Zeitbereich); (3) der Abstand, Δt (graue waagerechte Pfeile), zum vorher detektierten Signalphoton (μs - bis ms-Zeitbereich) als Maß für die makroskopische Zeit der Detektion innerhalb des

Experiments und für die Zählrate des Signals; (4) die Kanalnummer, ch# (1 bis 4), die jedem Signalphoton die Nummer des Detektors, in dem die Detektion erfolgte, und damit die Polarisationsrichtung relativ zum Anregungslicht und den Wellenlängenbereich (hier größer oder kleiner 620 nm) zuordnet.

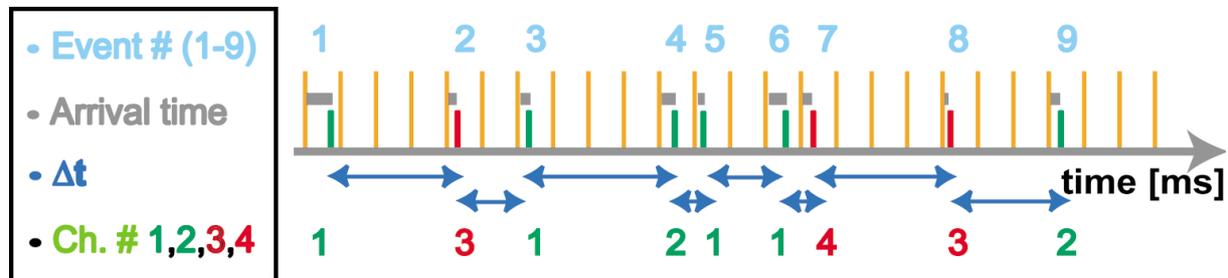


Abbildung 2.5.2.2-1: Prinzip der Datenaufnahme der BIFL-Methode: Photonenemission auslösende Laserpulse (senkrecht orangene Linien); zu jedem detektierten Photon (kleine senkrechte Linien) werden vier Parameter gespeichert: Ereignisnummer, ev#, Abklingzeit, $\Delta\tau$ (graue Balken); Zeitabstand, Δt , zwischen zwei detektierten Photonen (blaue Pfeile); Kanalnummer, ch# (Details s. Text).

2.5.2.1.3 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Mit der zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung wird der BIFL-Methode die Möglichkeit zur zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie eröffnet. Eine detaillierte Darstellung dieser Methode wurde von Brand^[59] veröffentlicht. Den Kernpunkt dieser Methode stellt der Zeit-zu-Amplitude-Konvertierer (TAC) dar, bei dem der zeitliche Abstand zwischen der Detektion eines Photons und dem, dieses Photon auslösenden, Laserpuls gemessen wird. Der Laserpuls löst eine mit der Zeit linear aufsteigende Spannungsrampe aus, die durch die Detektion des Photons gestoppt wird. Der an dieser Stelle gemessene Spannungswert wird in eine Zeit umgerechnet und bestimmt die Abklingzeit, $\Delta\tau$. Im Fall einer hohen Pulswiederholungsrate wird der TAC in einem umgekehrten Modus betrieben, wobei das Detektionsereignis eines Photons als Startsignal der Spannungsrampe und der nächste Laserpuls als stoppendes Ereignis dient. Von der Statistik liefert dies das gleiche Ergebnis, nur vermeidet es Fehler, denn nicht jeder Laserpuls löst eine Detektion eines Photons aus^[59].

2.5.2.1.4 Fluoreszenzlebensdauerbestimmung: Maximum-Likelihood-Schätzer

Die Abklingzeiten, $\Delta\tau$, der detektierten Photonen bestimmen die Lebensdauer der Fluoreszenz. Hierzu werden Häufigkeits-Histogramme erstellt und durch Anpassung eines

Modells die charakteristische Abklingzeit, d.h. die Lebensdauer der Fluoreszenz ermittelt. Die Anpassung erfolgt hierbei durch einen Maximum-Likelihood-Schätzer^[59-61].

Diese Häufigkeits-Histogramme bestehen hier aus $k = 256$ Kanälen in einem endlichen zeitlichen Meßfenster der Breite, $T = 12.5$ ns, in die die entsprechenden Einzelereignisse, $\Delta\tau$, eingeordnet werden und im i -ten Kanal eine Akkumulation, c_i , ergeben. Da die Anzahl an detektierten Photonen in der Einzelmolekülspektroskopie klein, die Gesamtanzahl der Photonen, $C = \sum c_i$ ($i = 1$ bis k), jedoch bekannt ist, unterliegt die Streuung der Meßwerte der Multinomialverteilung^[66-68]. In der Anpassung wird die experimentell erhaltenen Wahrscheinlichkeit, Pd_i , c_i Ereignisse in dem i -ten Kanal zu detektieren, mit einem synthetisch generierten Wahrscheinlichkeitsmodell, Pp_i , verglichen.

Das detektierte Signal enthält variable Anteile an Fluoreszenz mit einer charakteristischen Lebensdauer, τ , und an Untergrundsignal, d.h. von Licht, das nicht aus dem Anregungsvolumen kommt (z.B. Ramanstreulicht, Umgebungslicht oder Fluoreszenzlicht von außerhalb des Anregungsfokus). Daher ist das Modell, $Pp_i(\tau, T, k, \gamma_B, PB)$, des zeitlichen Abfalls des Signals in dem i -ten Kanal durch einen variablen Anteil, γ_B , an Untergrund, $PB_i(T, k)$, und, $1 - \gamma_B$, an Fluoreszenz, $Pf_i(\tau, T, k)$, gegeben. Deren Normierung wird durch die Summenbildung über alle k Kanäle sichergestellt.

$$Pp_i(\tau, T, k, \gamma_B, PB) = \gamma_B \frac{PB_i(T, k)}{\sum_{i=0}^k PB_i(T, k)} + (1 - \gamma_B) \frac{Pf_i(\tau, T, k)}{\sum_{i=0}^k Pf_i(\tau, T, k)} \quad (2.5.2.1.4-1)$$

Das Untergrundsignal durch Ramanstreulicht ist identisch mit der Instrumentenfunktion, PB , die mit reinem Lösungsmittel experimentell bestimmt wird. Die Wahrscheinlichkeit, Pf_i , bei einem monoexponentiellen Fluoreszenzzerfall ein Ereignis in dem i -ten Kanal zu registrieren, kann in 2 Schritten berechnet werden: (1) u Kanäle der Dichtefunktion für die Instrumentenfunktion, PB , werden mit der Exponentialfunktion der Fluoreszenzlebensdauer, τ , gefaltet. (2) Da die Anregungsfrequenz, $f = 73$ MHz bzw. 76 MHz, des Lasers im Vergleich zu den Lebensdauern, $\tau > 3$ ns, hoch ist, muß berücksichtigt werden, daß der Fluoreszenzfarbstoff evtl. auch von vorhergehenden Laserpulsen angeregt wurde. Dadurch ergibt sich Pf_i durch eine Summe über mehrere Pulse, θ , vor dem Fluoreszenzphoton mit einem Kanalinkrement, $W = k/(T f)$.

$$Pf_i(\tau, T, k) = \sum_{v=0}^{\theta} \left(\sum_{j=0}^{\min(i, u)} PB_j \exp\left(\frac{-(i + vW - j)T}{\tau k}\right) \right) \quad (2.5.2.1.4-2)$$

In neueren Arbeiten wurde ein Ausdruck abgeleitet, der die äußere Summenbildung umgeht und zu einem schnelleren Algorithmus führt^[63,65].

Die Güte der Anpassung wird durch einen Maximum-Likelihood-Schätzer^[59,69,70] basierend auf der Multinomialverteilung überprüft. Dabei dient das reduzierte $2I_r^*$ als Güteparameter, das durch Variation der beiden Parameter, τ und γ_B , minimiert wird^[59,60,61,65].

$$2I_r^* = \frac{2}{k-3} \sum_{i=1}^k c_i \ln \left(\frac{c_i}{C \text{Pp}_i(\tau, T, k, \gamma_B, \text{PB})} \right) \quad (2.5.2.1.4-3)$$

Die Standardabweichung, $\sigma(\tau)$, der ermittelten Fluoreszenzlebensdauer, τ , zeigt dann folgende Abhängigkeit^[59,60].

$$\sigma(\tau) \propto \frac{\tau}{\sqrt{N}} \quad (2.5.2.1.4-4)$$

2.5.2.1.5 Datenselektion

Die Selektion eines Einzelmolekülereignisses aus den aufgezeichneten den Daten erfolgt mit Hilfe der Zeitabstandsinformation, Δt , eines jeden Photons. Abbildung 2.5.2.1.5-1 a zeigt dieses Δt aufgetragen gegen die Ereignisnummer, $ev\#$, eines jeden Photons für eine Einzelmolekülmessung an Rhodamin6G in Wasser. Während einer Einzelmolekülmessung besteht das Fluoreszenzsignal überwiegend aus Untergrundsignal mit einer niedrigen Zählrate und damit einem relativ hohen zeitlichen Abstand, Δt , zwischen zwei Photonen (z.B. Ereignisnummern 0 bis 2000). Diffundiert ein Fluorophor durch das Detektionsvolumen, so führt die wiederholte Anregung durch das gepulste Laserlicht zur Fluoreszenzemission, wodurch die detektierte Signalzählrate stark erhöht wird und dadurch der Abstand, Δt , auf sehr niedrige Werte abfällt (z.B. Ereignisnummern 8000 bis 8500). Verläßt der Fluorophor das Detektionsvolumen oder wird er durch das Laserlicht zerstört (Photozerstörung), so stoppt die Fluoreszenzemission und die Signalzählrate sinkt wieder auf das Untergrundniveau, wodurch die mittlere Zeit, Δt , wieder ansteigt. Da nur Fluoreszenzereignisse für die weitere Datenanalyse von Interesse sind, wird der Wert, Δt , als Selektionskriterium für tatsächliche Fluoreszenzereignisse gewählt. Dazu werden die Δt -Daten mit Hilfe eines LEE-Filters geglättet^[71]. Eine bestimmte minimale Anzahl an aufeinanderfolgenden Photonen mit einem geglätteten Δt -Wert unter einem bestimmten Schwellenwert wird als ein Einzelmolekülereignis gewertet. Dies ist in Abbildung 2.5.2.1.5-1 b dargestellt. Hier wurden

die Daten aus Abbildung 2.5.2.1.5-1 a verwendet. Aus den mit den LEE-Filter-Parametern, Breite $m = 30$ und Abweichung $s_0 = 10$, geglätteten Daten wurden nur solche Abfälle in der Abstandszeit, Δt , als Fluoreszenzereignisse (schwarze Punkte) herausgeschnitten, bei denen mindestens 50 Photonen einen Wert, $\Delta t < 0,035$ ms (schwarze Linie), besitzen. Diese Fluoreszenzereignisse stellen die Detektion eines einzelnen Moleküls, also ein Einzelmolekülereignis dar. Im Folgenden wird nun, unter Beibehaltung der Originalwerte, $ev\#$, Δt , $\Delta\tau$ und $ch\#$, jedes selektierte Photon der Datenanalyse unterzogen.

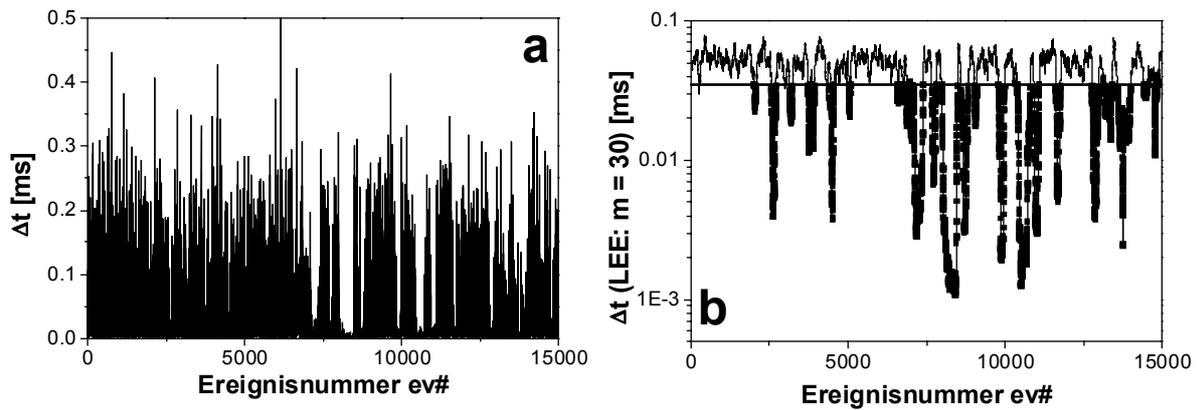


Abbildung 2.5.2.1.5-1: Prinzip der Datenselektion durch BIFL: (a) originale Abstandszeiten, Δt , der detektierten Photonen gegen ihre Ereignisnummer, $ev\#$, von Rhodamin6G (10^{-11} M) in Puffer (experimentelle Parameter: 528 nm, $I_0 = 140$ kW/cm², $\omega_0 = 0,6$ μ m, $z_0/\omega_0 = 2,5$). (b) Lee-gefilterte (Gl. (3.7-5), $m = 30$, $s_0 = 10$) Daten aus (a), Schwellenkriterium (waagerechte Linie, $\Delta t^* = 0,035$ ms) und selektierte Fluoreszenzereignisse (schwarze Kästchen).

Die Glättung der Daten erfolgt hier durch die Anwendung eines LEE-Filters^[71]. Dieser Filter glättet poissonverteilten Untergrund; Signalspitzen bleiben erhalten. Der LEE-Filter der Breite, m , und der Abweichung, s_0 , angewendet auf den diskreten Datensatz des Zeitabstands, $\Delta t(i)$, von M Photonen mit den Ereignisnummern, $i = ev\#$, ist definiert durch:

$$\overline{\Delta t}(k) = \frac{1}{2m+1} \sum_{j=-m}^m \Delta t(k+j) \quad m < k < M-m$$

$$\sigma_k^2 = \frac{1}{2m+1} \sum_{j=-m}^m [\Delta t(k+j) - \overline{\Delta t}(k+j)]^2 \quad 2m < k < M-2m$$

Die gefilterten Daten, $\Delta t^*(i)$, sind durch folgenden Ausdruck gegeben.

$$\Delta t^*(i) = \overline{\Delta t}(i) + (\Delta t(i) - \overline{\Delta t}(i)) \frac{\sigma_k^2}{\sigma_k^2 + s_0^2} \quad (2.5.2.1.5-1)$$

Der Filter mit den charakteristischen Parametern (Breite m und Abweichung s_0) ist daher nur für Photonen mit den Ereignisnummer $2m < i < M-2m$ definiert.)

2.5.2.1.6 Datenanalyse durch integrierte Studien

Die selektierten Daten können jetzt durch verschiedene Analysealgorithmen analysiert werden.

Aus den Abklingzeiten, $\Delta\tau$, aller in einem selektierten Fluoreszenzeignis enthaltenen Photonen wird ein Häufigkeitshistogramm erstellt und gemäß Gl. (2.5.2.1.5-1) bis (2.5.2.1.5-3) die charakteristische Abfallszeit, d.h. die Lebensdauer, τ , der Fluoreszenz und der Untergrundanteil, γ_B , des gesamten Ereignis bestimmt. Aufgrund der Kanalnummer, $ch\#$, ist die Polarisationsrichtung relativ zu dem Anregungslicht und der Wellenlängenbereich eines jeden Photons bekannt und zur Bestimmung der Fluoreszenzanisotropie, r_F , bzw. des Verhältnisses, G_{FRET} , der Signale der beiden Wellenlängenbereiche des gesamten Fluoreszenzereignisses herangezogen werden. Die Anzahl der Photonen, N_F , und die Zeitdauer, t_B , des Fluoreszenzereignisses, die durch Summation über die Abstandsinformation, Δt , aller geschnittenen Photonen gewonnen werden kann, bestimmen die Fluoreszenzintensität, $F = N_F/t_B = N_F/(\sum\Delta t)$. Diese über das Einzelmolekülereignis integrierte Analyse dient z.B. zur Identifizierung einzelner Moleküle durch ihre charakteristischen Fluoreszenzparameter.

2.5.2.1.7 Vielkanalzählerspur (MCS)

Eine genaue Analyse der Fluoreszenzschwankungen ist durch eine Vielkanalzählerspur (MCS, „Multi-Channel-Scaler“) möglich. Sie gibt Aufschluß über Schwankungen in der Fluoreszenzzählrate. Die Vielkanalzählerspur besteht aus einer Anzahl, M , an konstanten Zeitintervallen, T_{IV} , wobei über die gesamte Meßzeit, $M T_{IV}$, kontinuierlich die Anzahlen, $N_F(t = iT_{IV})$, an in dem jeweiligen Zeitintervall, $(iT_{IV}) \leq t < ((i+1)T_{IV})$, registrierten Photonen als Maß für die Signalstärke zu diesem Zeitpunkt berechnet werden. Dabei bestimmt T_{IV} die Zeitaufösung dieser Methode. Aufgrund der Zeitinformaton, Δt , das die makroskopische Zeit, t , eines jeden Photons festlegt, ist es mit BIFL möglich eine Vielkanalzählerspur mit beliebigen Zeitfenstern, T_{IV} , und mit beliebig ausgewählten Photonen aufzubauen. Eine kinetische Analyse möglicher Prozesse, die zu Schwankungen in dieser Vielkanalzählerspur führen, ist nun über die Korrelation möglich. Eine statistische Analyse bietet die Verteilungsdichte der Vielkanalzählerspur, d.h. der Fluoreszenzzählrate .

2.5.2.1.8 Konfokales Mikroskop

Alle Einzelmolekül- und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopiemessungen wurden an einem epi-illuminierten konfokalen Mikroskop durchgeführt. Der Grundkörper besteht aus einem inversen IX70-Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) mit einer Eigenbau-Detektionseinheit (MPI-Werkstatt, Göttingen). In Abbildung 2.5.2.1.1-1 ist der schematische Aufbau dargestellt. Das Mikroskop ist mit dem Objektiv „UPlanapo 60×, NA 1,2, Wasser“ (Olympus) ausgestattet.

2.5.2.1.9 Laserlichtquellen

Als Anregungslichtquellen standen folgende Laser zur Verfügung:

- ein Argon-Ionen Laser (Sabre, Coherent) für gepulstes (aktiver Modenkoppler (APE, Berlin), Pulslänge ca. 180 ps, Pulsfrequenz 73 MHz) oder kontinuierliches Laserlicht bei 496nm.
- ein Krypton Laser (Innova 400, Coherent) für kontinuierliches Laserlicht bei 647 nm.

Für linear polarisiertes Anregungslicht wurde ein Glan-Tompson Polarisator (B. Halle Nachf., Berlin) in den Strahlengang eingebaut. Zur Abschwächung und Regulierung der Anregungsleistung dienten OD-Filter (New Focus, Santa Clara, Ca). Die Anregungsleistungen wurden mit Leistungsmeßköpfen (Fieldmaster, Coherent) vermessen. Die zugehörige Leistungsdichte kann über den Fokusbereich, der durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie bestimmt wurde, berechnet werden.

2.5.2.1.10 Teleskop und Linsen

Das Teleskop bestand aus zwei aufeinanderfolgenden Linsen und diente zur Aufweitung und Parallelisierung des Laserstrahls. Hierdurch kann der Radius des Laserfokus in der Probe zwischen 0,5 μm und 4 μm variiert werden. Alle eingesetzten Linsen (Fokuslängen zwischen 40 mm und 500 mm, Spindler & Hoyer, Göttingen) bestehen aus Quarz-Suprasil und sind mit einer Antireflexbeschichtung (ARB2-UV) versehen.

2.5.2.1.11 Dichroitische Strahlteiler und Fluoreszenzfilter

Die dichroitischen Strahlteiler (DS) reflektieren Licht der Anregungswellenlänge und sind transparent für das Fluoreszenzlicht. Die Fluoreszenzfilter (IF) sind Interferenzfilter, die Licht der Anregungswellenlänge um einen Faktor 10^5 bis 10^6 und der Ramanwellenlänge des Lösungsmittels um einen Faktor größer 100 schwächen und möglichst transparent (90% bis 95%) für das Fluoreszenzlicht sind. Beide Komponenten werden in den Strahlengang gelegt, um Anregungs- (Rayleigh-) und Ramanstreulicht im Fluoreszenzlicht zu unterdrücken. Folgende dichroitische Strahlteiler und Interferenzfilter wurden für die verschiedenen Farbstoffe und Anregungswellenlängen eingesetzt:

- Anregung von Alexa488 bei 496,5 nm:

(DS) 498DCLP, Q505LP-XR, 510DCLP, 525DCLP, Q530LP-XR (AHF),

(IF) HQ 535/50 (AHF)

- Anregung von Alexa488 bei 496,5 nm und gleichzeitige Anregung von Cy5 bei 647 nm:

(DS) 502/636PC (AHF),

(IF) HQ 535/50 (AHF), HQ 730/140 (AHF)

2.5.2.1.12 Lochblende

Die Lochblende (Owis, Staufen) diente zum Abblocken von Untergrundsignal, d.h. von Licht, das nicht aus dem Anregungsvolumen kommt (z.B. Umgebungslicht oder Fluoreszenzlicht von außerhalb des Anregungsfokus), und zur Begrenzung der Tiefe des offenen Detektionsvolumens. Der Durchmesser der Lochblende (zwischen 50 μm und 400 μm) bestimmt entscheidend die räumliche Sammeleffizienz der Fluoreszenz und führt zu einem offenen Detektionsvolumen in der Größenordnung mehrerer Femtoliter.

2.5.2.1.13 Detektoren

Es wurden Einzelphotonen-Avalanchephotodioden (EG&G, Vaudreuil, Quebec, Kanada) benutzt.

2.5.2.1.14 Fluoreszenzstrahlteiler

Zur Aufspaltung der Fluoreszenz standen folgende Komponenten zur Verfügung:

- Polarisations-Strahlteiler (Gsänger, Planegg) zur Aufspaltung in die parallel bzw. senkrecht polarisierte Fluoreszenzlichtkomponente relativ zum Anregungslicht.

- dichroitischer Farbteiler (DF) 620 DCXR (AHF) zur Trennung des Fluoreszenzlichtes in Komponenten oberhalb und unterhalb 620 nm (für FRET Experimente).

2.5.2.1.15 Elektronische Datenverarbeitung

- Multiplexer: Zur Vervielfältigung der elektronischen Detektorsignale (Eigenbau der MPI-Werkstatt, Göttingen).
- Vielkanalzähler (MCS): PC-Einsteckkarte (CTR-05, Plug in, Eichenau) zur Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzzählrate: der Vielkanalzähler summiert die Anzahl der Detektorsignale für ein vorgegebenes Zeitintervall (z.B. 1 ms, minimale Intervallbreite 5 μ s) auf und stellt diese Ereigniszahl als Funktion der makroskopischen Meßzeit (mehrere Sekunden) dar.
- BIFL : PC-Einsteckkarte (SPC 432, Becker & Hickl GmbH, Berlin, oder Eigenbau der MPI-Werkstatt, Göttingen) für die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung bei zeitaufgelösten Einzelmolekülexperimenten.

2.5.2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ist die strahlungslose Energieübertragung durch Resonanz zwischen Chromophoren. Dabei ist der Donor das Molekül, das die Energie abgibt und der Akzeptor das Molekül, welches die Energie aufnimmt. Die Methode ist in bestimmten Abstandsbereichen sehr empfindlich und kann zur Abstandsbestimmung im Bereich von 10-80 Å verwendet werden.

Eine Voraussetzung für den FRET ist, daß das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Desweiteren dürfen die Übergangsdipolmomente der beiden Chromophore nicht senkrecht angeordnet sein. Ihre Anordnung wird durch den Orientierungsfaktor κ^2 beschrieben, der oft vereinfacht als 2/3 angenommen wird, was aber nur für eine statistische Orientierung frei beweglicher Chromophore gilt.

Das Ausmaß der Energieübertragung hängt von vielen Faktoren ab und wird durch die Transfereffizienz E_{trans} beschrieben:

$$E_{\text{trans}} = 1 - \frac{\Phi_{\text{DA}}}{\Phi_{\text{D}}} = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} ,$$

hierbei sind Φ_D und Φ_{DA} die Quantenausbeuten des Donors in Ab- bzw. Anwesenheit des Akzeptors. R ist der Abstand von Donor und Akzeptor und R_0 der Försterradius. Der Försterradius ist für jedes Paar von Fluorophoren verschieden und definiert sich nach

$$R_0 = 9.78 \times 10^3 \{ \Phi_D \kappa^2 n^{-4} J \}^{1/6} \text{ [Å]}.$$

J ist die Größe des Überlappungsintegrals zwischen dem Fluoreszenzspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, n der Brechungsindex des Mediums. Abbildung 2.5.2.2-1 verdeutlicht, daß Änderungen des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor besonders im Bereich des Försterradius große Auswirkungen auf die Transfereffizienz haben. Entscheidend zur Messung von Abstandsänderungen ist daher, daß der Abstand zwischen Donor und Akzeptor im Bereich von $1 \pm 0,5 \cdot R_0$ liegt. Der Försterradius für das in dieser Arbeit verwendete Donor/Akzeptor-Paar Alexa488/Cy5 beträgt $51 \text{ Å}^{[72]}$.

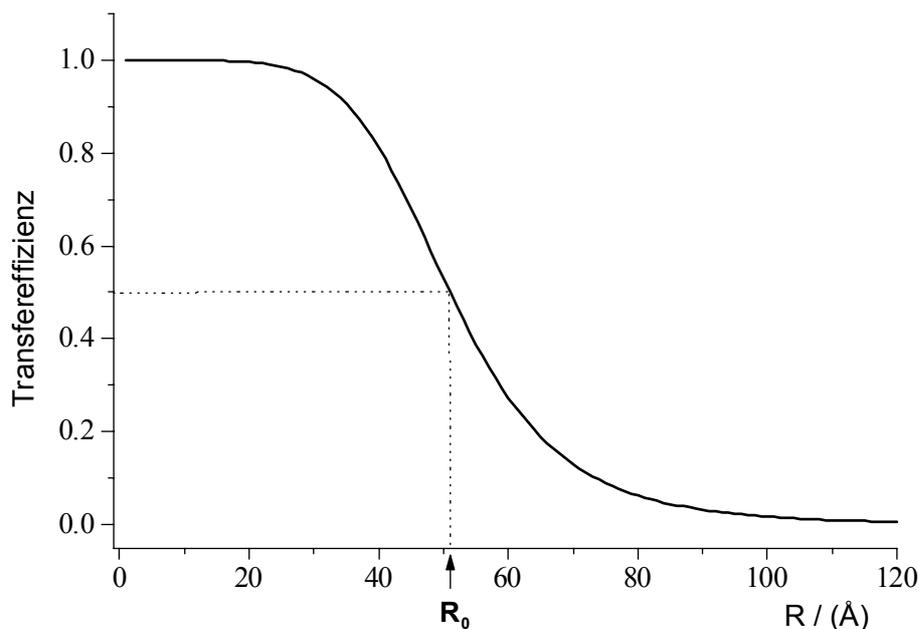


Abbildung 2.5.2.2-1: Auftragung der Transfereffizienz gegen den Abstand von Donor und Akzeptor mit einem Försterradius von $R_0 = 51 \text{ Å}$.

2.5.2.3 Probenvorbereitung

Alle in dieser Arbeit gezeigten Fluoreszenzmessungen am konfokalen Mikroskop wurden an einem offenen Tropfen ($100 \mu\text{l}$) durchgeführt, der auf einem Deckglas mit einer Dicke von $0,13 \text{ mm}$ bis $0,17 \text{ mm}$ (Roth) plaziert wurde. Hierbei bildet das Deckglas den Boden einer mit Wasserdampf gesättigten, abgeschlossenen Kammer, die die Verdunstung des Tropfens

verhinderte. Testexperimente haben gezeigt, daß RT oder RT-Primer/Matrize Komplexe stark an das Glas adsorbieren, wodurch sich die Konzentration in der Probe innerhalb einer Messung erheblich verringerte. Daher wurde für alle in dieser Arbeit gezeigten Messungen, zur Reduktion der Adsorption unmittelbar vor jeder Messung das Deckglas mit einer Caseinschicht versehen. Hierzu wurden 200 µl 1mg/ml Casein-Lösung (in Wasser) auf das Deckglas gegeben und eine Minute bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung möglichst vollständig abgehoben und die benetzte Fläche 10 Mal mit 100µl Wasser gespült.

Die Konzentration der RT in der Meßlösung variierten bei den Messungen zwischen 50 pM und 100 pM, wobei das molare Verhältnis zwischen RT und Ligand immer 1:4 betrug. Für alle Messungen wurde folgender Puffer verwendet: 25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM KCl und 6 mM MgCl₂. Zur Reinigung des Puffers wurde dieser als 10xPuffer angesetzt und mindestens 12 Stunden über Aktivkohle aufbewahrt. Der Überstand wurde dann zum Gebrauch entsprechend mit Wasser verdünnt.

Alle gemessenen Lösungen, die RT-Nukleinsäure Komplexe enthielten, wurden direkt vor der Messung durch zwei Verdünnungsschritte (1.Schritt: 1:100, 2.Schritt: 1:25 – 1:50) aus einer Stocklösung mit 250nM RT / 1µM Nukleinsäure hergestellt, wobei die 2. Verdünnung bereits auf dem Deckglas stattfand.

2.6 Verwendete Materialien

2.6.1 Zellstamm

E. coli-Stamm M15

Genotyp: *Nal^S*, *Str^S*, *rif^S*, *lac*, *ara*, *gal*, *mtl*, *recA*

Herkunft: MPI f. med. Forschung, Abt. Biophysik, Heidelberg

2.6.2 Plasmide

pRT166

Eigenschaften: Amp^r, HIV-1 RT p66 (Stamm BH10)

Vektor: pKK 233-2 (Pharmacia)

Herkunft: MPI f. med. Forschung, Abt. Biophysik, Heidelberg^[73]

p6HRT51

Eigenschaften: Amp^r, HIV-1 RT p6H51 (Stamm HXB2)^[74]

Vektor: pdS56RBSII

Herkunft: Roche^[74]

pDMI.1

Eigenschaften: Kan^r, lac IQ-Repressor

Herkunft: Certa *et al.*^[45]

2.6.3 Enzyme

2.6.3.1 Restriktionsendonukleasen

BamHI	Boehringer, Mannheim
EcoRI	Pharmacia Biotech, Freiburg
EcoRV	Boehringer, Mannheim
HindIII	Pharmacia Biotech, Freiburg

2.6.3.2 DNA-modifizierende Enzyme

AmpliTaq DNA-Polymerase	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Lysozym	Boehringer, Mannheim
RNase A	Boehringer, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Life Technologies, Karlsruhe
Pfu DNA-Polymerase	Pharmacia Biotech, Freiburg

2.3.3.3 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Baker (Deventer), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) bezogen. RNase-freie Chemikalien wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Accugel 40% (Acrylamid/Bisacrylamid, 29: 1)	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Alexa Fluor® 488 C5-maleimide	Molecular Probes, Eugene
Ampicillin	Boehringer, Mannheim

DTT	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
EDTA	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
IPTG	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Kanamycin	AGS, Heidelberg
Methyl-[³ H]-TTP (65Ci/mmoi)	ICN, Meckenheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Poly(rA)/oligo(dT) ₁₂₋₁₈	Boehringer, Mannheim
Rhodamine Green Reference Standard	Molecular Probes, Eugene
Szintillationsflüssigkeit (Betaplate Scint)	Berthold, Bad Wildbach
Tris	ICN, Meckenheim

Die NNRTIs S-TIBO und Nevirapine würden freundlicherweise von Dr. A. Mertens (Boehringer Mannheim) zur Verfügung gestellt.

2.3.3.4 Verbrauchsmaterialien

Biomax 5 Ultrafree-Zentrifugationsfilter	(Millipore, Erkrath)
DEAE-Cellulose-Papier (DES 1)	Whatman, Maidson
DEAE Sepharose Fast Flow	Pharmacia, Freiburg
Dialysehülsen UH 100/75	Schleicher&Schuell, Dassel
NAP-5 Gelfiltrationssäulen (Sephadex G-25)	Pharmacia, Freiburg
Ni-NTA Fast Flow	Qiagen, Hilden

2.3.3.5 Medien und Puffer

A78-Puffer	50 mM	Phoshat-Puffer, pH 7,8
	25 mM	NaCl
DNA-Probenpuffer (5-fach Konzentriert)	25 %	Ficoll
	0,125 %	Bromphenolblau
	0,125 %	Xylencyanol
	10 mM	EDTA
Hybridisierungspuffer	25 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	25 mM	NaCl

LB-Medium, 1 mM MgCl ₂ , 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,3 (für 1l)	16 g 10 g 10 ml	Bacto-Trypton Hefeextrakt Glycerin
RT-D-10-Puffer	50 mM 25 mM 10 % 1 mM	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl Glycerin EDTA
RT-Reaktionspuffer	50 mM 50 mM 10 mM 1 mM	KCl Tris-HCl, pH 8,0 MgCl ₂ DTT
Sammelgel-Puffer	0,25 M 0,2 %	Tris-HCl, pH 6,8 SDS
TBE-Puffer (10-fach konzentriert)	890 mM 890 mM 20 mM	Tris-Base Borsäure EDTA, pH 8,0
Terminator-Mix	0,42 U/μl 168,42 mM 42,1 mM 4,21 mM 1,58 μM 94,74 μM 0,42 μM 47,37 μM 15,79 μM 78,95 μM	AmpliTaq DNA-Polymerase Tris-HCl, pH 9,0 MgCl ₂ (NH ₄) ₂ SO ₄ A-DyeDeoxy T-DyeDeoxy G-DyeDeoxy C-DyeDeoxy dATP, dTTP, dCTP dITP
Trenngel-Puffer	0,75 M 0,2 %	Tris-HCl, pH 8,8 SDS

T4 DNA-Ligase-Puffer 5x	100 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	25 mM	MgCl ₂
	25 mM	DTT
	1 mM	ATP
	25 % (w/v)	BSA
	7,5 % (w/v)	PEG 600

3 Experimente und Ergebnisse

3.1. Klonierung, Expression und Reinigung von HIV-1 RT Mutanten

Für die gezielte, ortsspezifische Markierung der Reversen Transkriptase mit Reportergruppen bieten sich Cysteinreste an, da diese spezifisch mit verschiedenen Substanzklassen, wie Iodacetamiden, Maleimiden und Thiosulfonaten reagieren.

Die heterodimere HIV-1 RT enthält vier natürliche Cysteine, jeweils an Position 38 und 280 in p66 und in p51. In der Kristallstruktur der HIV-1 RT^[31] wird deutlich, daß das Cys38 in der p51-Untereinheit nicht für das Lösungsmittel zugänglich ist und daher auch nicht durch Reportergruppen markierbar sein sollte. Die restlichen drei Cysteine des p66/p51 sind, nach der Kristallstruktur zu urteilen, für das Lösungsmittel zugänglich und sollten daher durch Reportergruppen markierbar sein. Da die Positionen der natürlichen Cysteinreste für die geplanten Experimente nicht geeignet sind wurde zunächst eine quasi Cystein-freie RT Mutante hergestellt, die nur noch das unzugängliche Cys38 in der p51-Untereinheit enthält und deren andere Cysteinreste 38 und 280 in p66 sowie 280 in p51 durch Serine ausgetauscht wurden. Anschließend konnten gezielt neue Cysteine eingeführt.

Um gezielt in den einzelnen Untereinheiten Cysteinreste einzuführen wurden die Untereinheiten getrennt voneinander mutiert und in *E.coli* exprimiert. Durch Ko-Homogenisation der *E.coli*-Zellen aus der Expression konnte dann das heterodimere Enzym rekonstituiert und aufgereinigt werden.

Für die Expression von p66 und p51 wurden die Plasmide pRT166, bzw. p6HRT51 benutzt

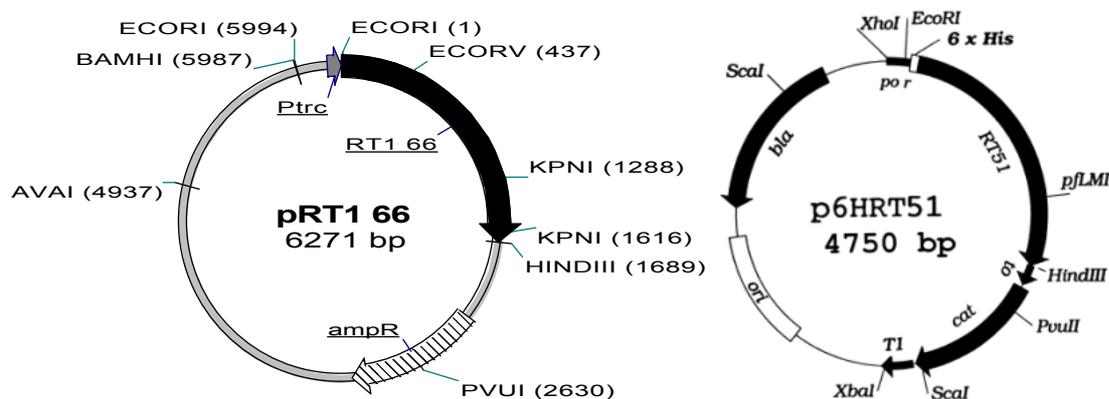


Abbildung 3.1-1: Expressionsplasmide für die beiden Untereinheiten der HIV-1 RT. Gezeigt sind die für die Klonierungen wichtigen Restriktionsschnittstellen sowie die offenen Leseraster der RT (RT166 bzw. 6HRT51), des Resistenzgens bla (ampR) für die Ampizillinresistenz und des Promotors (Ptrc).

(siehe Abb. 3.1-1) ^[48,49]. Die Ausgangsvektoren waren die Expressionsvektoren pKK233-2 bzw. pdS56RBSII. Das klonierte RT-Gen wurde jeweils dem HIV-1 Stamm BH10 bzw. HXB2 entnommen ^[72,75,76].

3.1.1 Zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe der überlappenden PCR

Ausgehend von den Expressionsplasmiden pRT1₆₆ und p6HRT51 wurden die RT Mutanten durch zielgerichtete Mutagenese mittels überlappenden PCR (s. 2.1.12) hergestellt. Die Einführung einer Mutation sei im Folgenden am Beispiel der Mutagenese von p66^(C38S) → p66^(C38S/C280S) gezeigt.

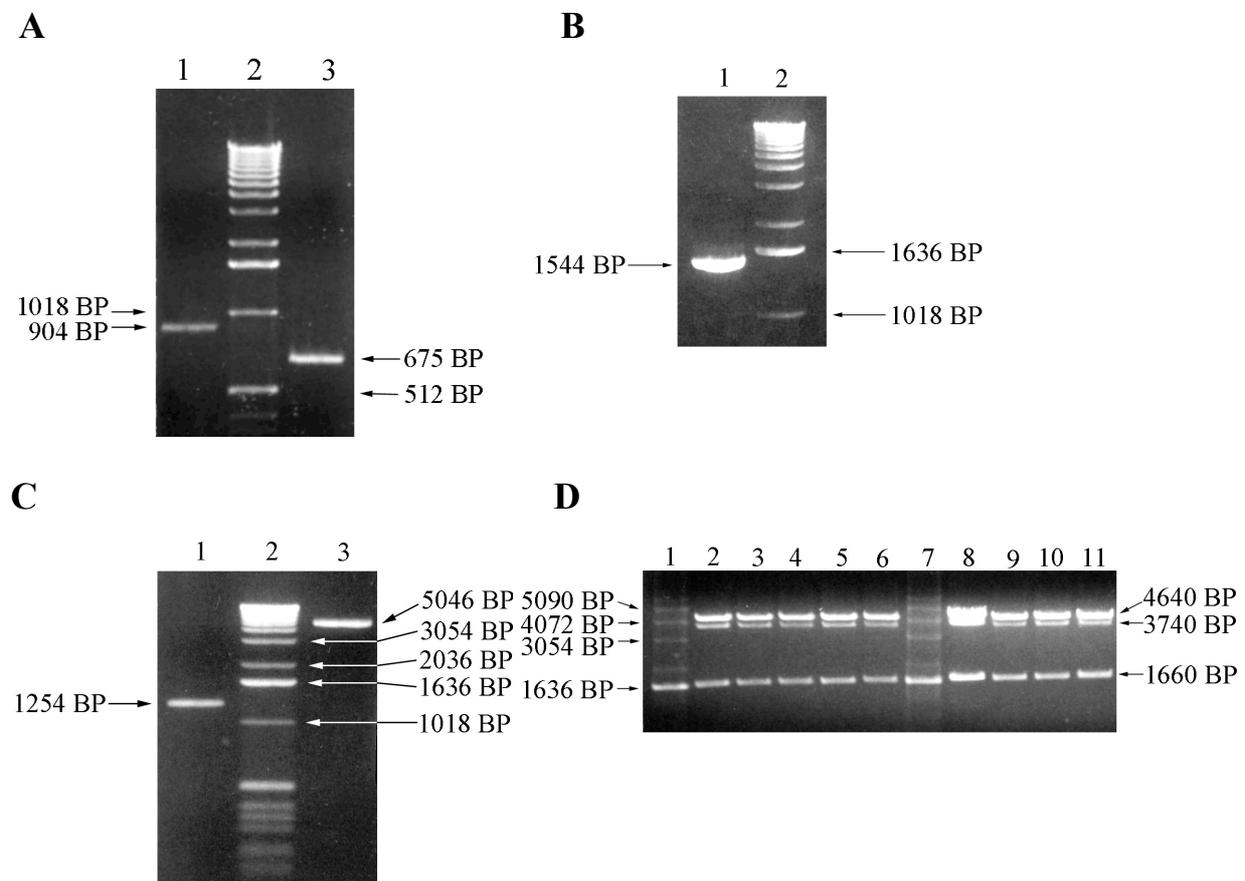


Abbildung 3.1.1-1: Reaktionsprodukte aus den drei PCR-Reaktionen der zielgerichteten Mutagenese. **A**, Spur 1: 1. PCR, Spur 2: Längenstandard (LS), Spur 3: 2. PCR; **B**, Spur 1: 3. PCR, Spur 2: LS; **C**, Spur 1: Isoliertes Fragment aus Restriktion des Produktes aus 3. PCR mit EcoRV und HindIII, Spur 2: LS, Spur 3: Isoliertes Fragment aus Restriktion von pRT1₆₆(C38S) mit EcoRV und HindIII; **D**, Restriktion der aus verschiedenen Kolonien isolierten Plasmid DNA mit EcoRI und HindIII, nach Transformation von *E.coli*.

Zu Beginn werden zwei PCR-Reaktionen parallel ausgeführt, in denen das Plasmid pRT1₆₆(C38S), (a) mit den Primern C280Sense und QX66anti und (b) mit den Primern

C280Santi und S68Csense umgesetzt wird. Die Reaktionsprodukte aus (a, 904 Basenpaare (BP)) und (b, 675 BP) sind in Abbildung 3.1.1-1 A dargestellt. In einem nächsten Schritt werden diese hybridisiert, die einzelsträngigen Bereiche aufgefüllt und dann mit den beiden äußeren Primern, nach dem Schema aus Abbildung 2.1.12-1, in einer dritten PCR-Reaktion umgesetzt. Das Reaktionsprodukt dieser dritten PCR-Reaktion ist in Abbildung 3.1.1-1 B dargestellt. Nach Isolierung des 1544 BP Fragmentes aus einem LM-Agarosegel wird es, wie auch das Plasmid, mit den Restriktionsenzymen EcoRV und HindIII verdaut. Die Restriktionsansätze werden auf ein LM aufgetragen und die entsprechenden Fragmente isoliert. Die isolierten Fragmente (Abbildung 3.1.1-1 C) werden anschließend ligiert und in den *E.coli* Stamm M15 transformiert. Nach der Transformation werden die Zellen auf LB-Platten (Amp, Kan) ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien dieser Platten werden dann angezogen, die Plasmid DNA isoliert und mit EcoRI und HindIII verdaut. Das Restriktionsmuster (Abbildung 3.1.1-1 D) gibt Aufschluß über den Erfolg der Ligation. Entspricht das Muster dem des für die Mutagenese eingesetzten unveränderten Vektor (Abbildung 3.1.1-1 D, Probe 8), so wurde das aus den PCR-Reaktionen gewonnene Fragment in den geschnittenen Vektor eingefügt. Durch Sequenzierung des Plasmids wird die Abfolge der Basen in dem veränderten Bereich auf die eingeführte Mutation hin überprüft.

3.1.2 Expression der Untereinheiten p66 und p51 von HIV-1 RT und Aufreinigung der heterodimeren p66/p51-Mutanten

Für die Expression der Untereinheiten p66 und p51 wurden *E. coli* Zellen des Stammes M15/pDMI.1, die das Lac-Repressorgen auf dem Plasmid pDMI.1 tragen, mit den Plasmiden pRT1₆₆ bzw. p6HRT51, welche die entsprechenden RT-Gene enthalten, transformiert. In diesen Systemen kann die durch den Lac-Repressor reprimierte Proteinexpression durch Zugabe des synthetischen Induktors IPTG aufgehoben werden. Das rekombinante Protein wird dann exprimiert, im Fall des p51 als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Histidinhexamer ([6H]). Hierdurch wird eine Reinigung des rekonstituierten heterodimeren p66/6H-p51 Proteins mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht.

Die Expression und Aufreinigung der RT-Mutanten ist im Folgenden am Beispiel des heterodimeren p66^(C38S/C280S)/6H-p51^(C280S) gezeigt.

In Abbildung 3.1.1-2 die Induktion der Expression von p66^(C38S/C280S) und 6H-p51^(C280S) dargestellt. Deutlich erkennbar werden die Proteine nach Zugabe von IPTG exprimiert, wobei die Expression der p51-Untereinheit ca. 10-15 mal stärker ist als die der p66-Untereinheit.

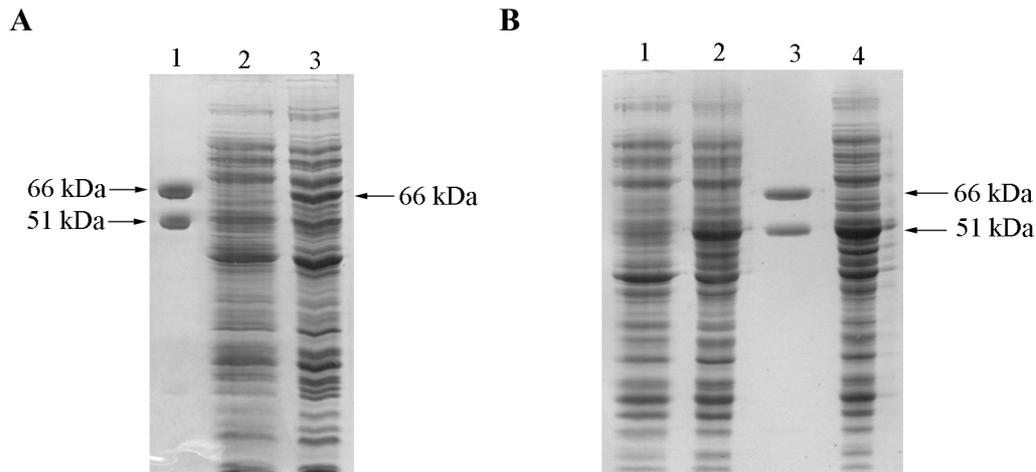


Abbildung 3.1.2-1: Induktion der Expression von p66^(C38S/C280S) und 6H-p51^(C280S) in M15. **A**, Spur 1: 500 μ g p66/p51, Spur 2: pRT166^(C38S/C280S) vor Induktion, Spur 3: pRT166^(C38S/C280S) 3h nach Induktion; **B**, Spur 1: p6HR51^(C280S) vor Induktion, Spur 2: p6HR51^(C280S) 1h nach Induktion, Spur 3: 500 μ g p66/p51, Spur 4: p6HR51^(C280S) 2h nach Induktion.

Zur Aufreinigung des heterodimeren p66^(C38S/C280S)/6H-p51^(C280S) werden *E.coli*-Zellen aus der Expression von p66^(C38S/C280S) und 6H-p51^(C280S) im Verhältnis 15:1 vereinigt und kohomogenisiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand zur Dimerisierung 10 h bei 4°C inkubiert und dann in einem ersten Schritt mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Abbildung 3.1.1.-3 zeigt das Elutionsprofil der Ni-NTA-Säule.

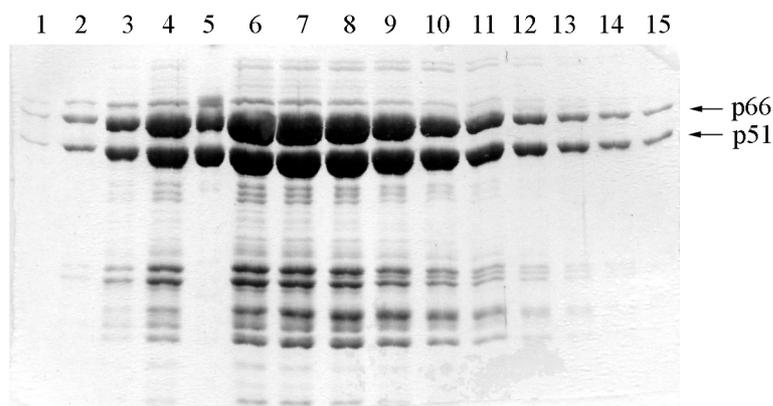


Abbildung 3.1.2.-2: SDS-PAGE des Elutionsprofils der Ni-NTA-Säule. In Spur 5 wurde bereits gereinigtes p66/p51 als Standard aufgetragen.

Die Fraktionen 1-4 und 6-15 der Ni-NTA-Säule werden vereinigt und über eine DEAE-Anionentauscher-Säule auf eine „Hi-Trap Sp“ Kationentauscher-Säule aufgetragen. In einem letzten Schritt wird das Protein von der Kationentauscher-Säule eluiert (Abbildung 3.1.1.-4), wodurch eine Trennung des Heterodimers von überschüssigem p51 und niedermolekularen

Verunreinigungen (ab Fraktion 24), möglich ist. Die Fraktionen 1-3 und 5-22 vereinig und aufkonzentriert.

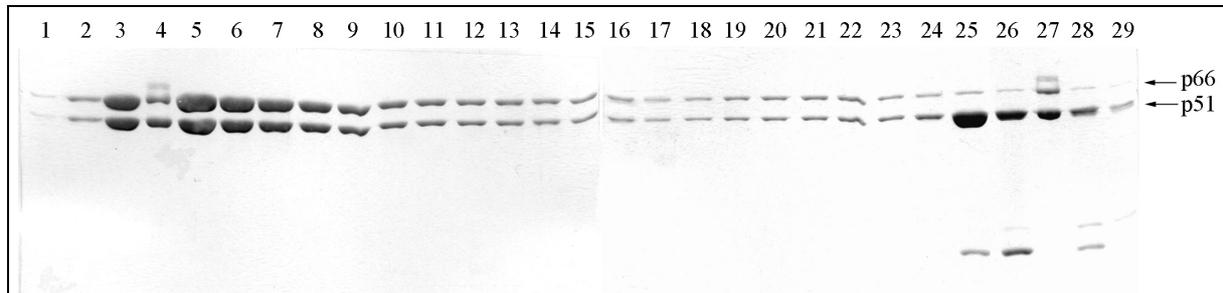


Abbildung 3.1.2.-3: SDS-PAGE des Elutionsprofils der HiTrap SP-Säule. In Spur 4 und 27 wurde bereits gereinigtes p66/p51 als Standard aufgetragen.

Die Reinheit der so gewonnen RT-Mutanten ist > 99%, die Ausbeute an heterodimer Protein betrug ca. 5mg pro 10 l p66-Expressionskultur.

In Tabelle 3.1.2.-4 sind alle im Rahmen dieser Arbeit exprimierten und aufgereinigten HIV-1 RT Mutanten aufgeführt.

In Tabelle 3.1.2.-4: Im Rahmen dieser Arbeit exprimierten und aufgereinigten HIV-1 RT Mutanten mit einem oder zwei freien Cysteinen.

RT-Mutanten, mit einem freien Cystein	RT-Mutanten, mit zwei freien Cysteinen
p66 ^(W24C, C38S, C280S) /6H-p51 ^(C280S)	p66 ^(W24C, C38S, C280S, K287C) /6H-p51 ^(C280S)
p66 ^(T27C, C38S, C280S) /6H-p51 ^(C280S)	p66 ^(T27C, C38S, C280S, K287C) /6H-p51 ^(C280S)
p66 ^(C38S, T69C, C280S) /6H-p51 ^(C280S)	
p66 ^(C38S, C280S, K287C) /6H-p51 ^(C280S)	
p66 ^(C38S, C280S) /6H-p51 ^(C280S, K281C)	

3.2 Markierung der RT-Mutanten mit MTSL-¹⁵N-d₁₅

RT-Mutanten mit einem oder zwei freien Cysteinen wurden wie in 2.2.4 beschrieben mit der Nitroxid-Spinsonde MTSL-¹⁵N-d₁₅ (MTSL-Nd) markiert. Der Markierungsgrad wurde durch vergleichen der Spinzahl (Konzentration der Spinsonde) mit der Konzentration des markierten Proteins der Lösung ermittelt und lag bei allen Proben zwischen 85% - 90%.

In Tabelle 3.2.-1 sind die in dieser Arbeit verwendeten, spinmarkierten Mutanten der HIV-1 RT aufgeführt.

Tabelle 3.2.-1: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellten spinmarkierten HIV-1 RT- Mutanten.

RT-Mutanten, mit einer Spinsonde	RT-Mutanten, mit zwei Spinsonden
p66 ^(W24C-MTSL-Nd, C38S, C280S) /6H-p51 ^(C280S)	p66 ^(W24C-MTSL-Nd, C38S, C280S, K287C-MTSL-Nd) /6H-
p66 ^(C38S, C280S, K287C-MTSL-Nd) /6H-p51 ^(C280S)	p51 ^(C280S)

Nach Mutagenese und Spinmarkierung zeigt die Mutante p66^(W24C-MTSL-Nd, C38S, C280S, K287C-MTSL-Nd)/6H-p51^(C280S) noch 50% der RNA abhängigen DNA Polymeraseaktivität von Wildtyp HIV-1 RT.

3.3 Markierung der RT-Mutanten mit Alexa Fluor[®] 488 C5 maleimide

RT-Mutanten mit einem freien Cysteinen wurden wie in 2.2.3 beschrieben mit Alexa Fluor[®] 488 C5-maleimid (Alexa488) markiert. Der Markierungsgrad wurde durch vergleichen der Absorption des Fluoreszenzfarbstoffes mit der Proteinkonzentration der Lösung des markierten Proteins ermittelt. Für die RT-Mutante p66^(C38S/C280S/K287C-Alexa488)/6H-p51^(C280S) sei dies im Folgenden exemplarisch gezeigt. Nach der Markierung und Aufreinigung des markierten Proteins wurden zwei Absorptionsmessungen, eine bei 280 nm und eine bei 493 nm durch geführt. Der Markierungsgrad ergibt sich dann nach folgender Formel:

$$\text{Markierungsgrad} = \frac{c_{\text{Alexa488}}}{c_{\text{RT}}} = \frac{A_{493\text{nm}} \cdot \epsilon_{\text{RT}}}{A_{280\text{nm}} \cdot \epsilon_{\text{Alexa488}}} = \frac{0,072 \cdot 260000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}}{0,256 \cdot 72000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}} = 1,02 \text{ mit}$$

c_{Alexa488} = Konzentration des Fluorophors Alexa488

c_{RT} = Konzentration der Reversen Transkriptase

$A_{493\text{nm}}$ = molarer Extinktionskoeffizient von Alexa488 bei 493 nm und

$A_{280\text{nm}}$ = molarer Extinktionskoeffizient der Reversen Transkriptase bei 280 nm.

Unter Berücksichtigung der Genauigkeit der Absorptionsmessung (Fehler $\approx 10\%$) kann bei einem Makierungsgrad von 1,02 auf eine vollständige Markierung des Cys287 in p66 von p66^(C38S/C280S/K287C)/6H-p51^(C280S) geschlossen werden.

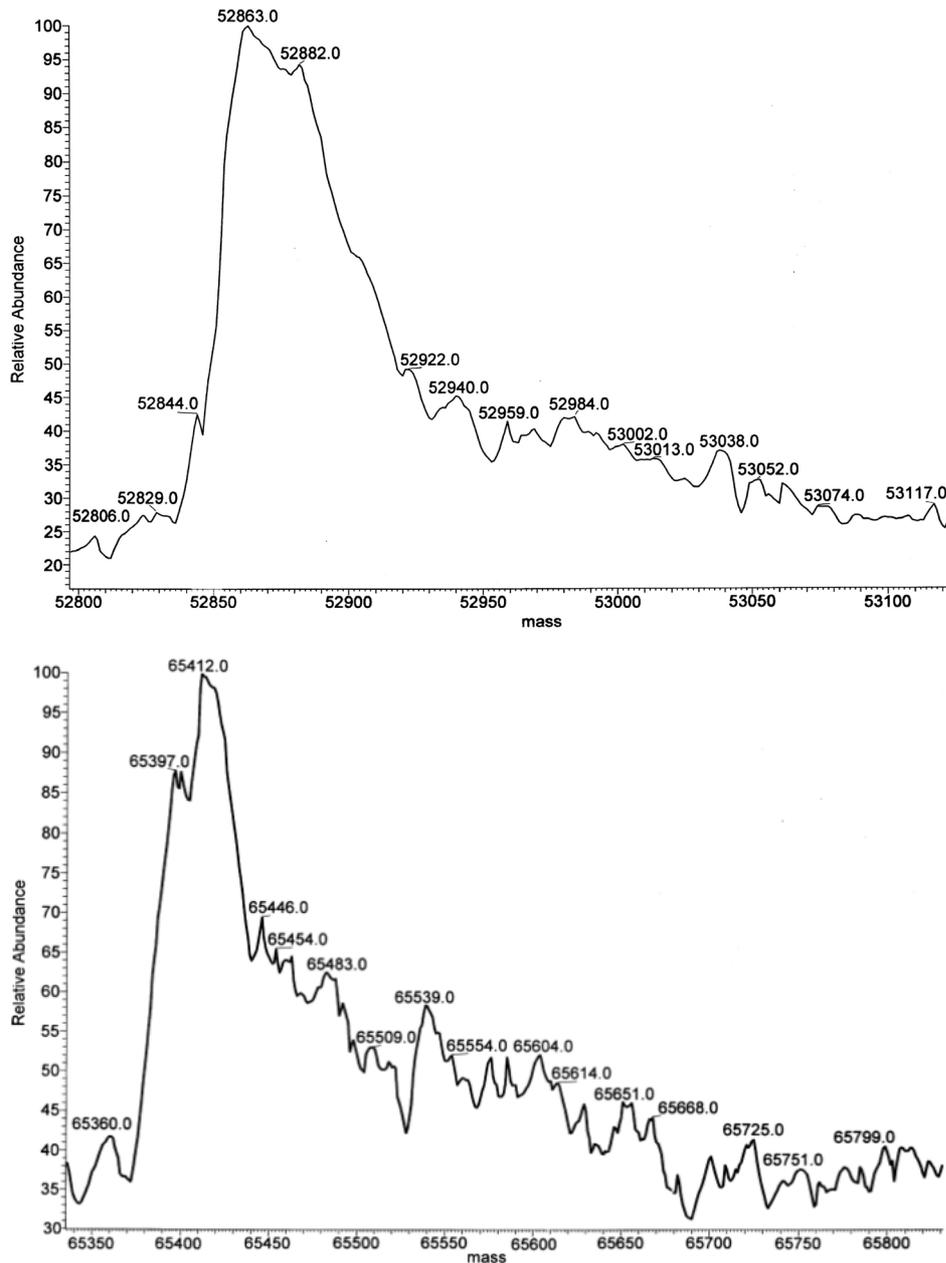


Abbildung 3.3-1: Massenspektrum der RT-Mutante $p66^{(C38S, C280S, K287C)}/6H-p51^{(C280S)}$ nach der Markierung mit Alexa488-maleimide. Die Hauptmassen können bei 52863 kDa und 65412 kDa identifiziert werden.

Zusätzlich wurde die Markierung in Einzelfällen durch ESI-Massenspektrometrie überprüft, um auszuschließen, daß auch andere Positionen markiert wurden. Abbildung 3.3.-1 zeigt Ausschnitte aus dem Massenspektrum der Mutante $p66^{(C38S, C280S, K287C)}/6H-p51^{(C280S)}$ nach der Markierung mit Alexa488-maleimid. Die Analyse der Masse der p51-Untereinheit in der unmarkierten RT-Mutante ergibt eine Masse von 52863 kDa. Für die markierte RT findet man im Rahmen der Meßgenauigkeit einen identischen Wert (52863 kDa). Für die Masse der p66-Untereinheit der unmarkierten RT-Mutante erhält man in der MS-Analyse einen Wert von 64707,5 kDa. Die mit Alexa488-maleimid markierte Mutante zeigt eine Masse von 65408

kDa. Diese ist in sehr guter Übereinstimmung mit der theoretisch bestimmten Masse von 65406 kDa, die sich aus der Summe der Masse der unmarkierten Mutante und der des Farbstoffrestes (698,7 kDa) ergibt. Weitere Massen, neben den beiden in Abbildung 3.3.-1 gezeigten, konnten im gesamten Spektrum nicht identifiziert werden.

In Tabelle 3.3.-1 sind die in dieser Arbeit verwendeten, fluoreszenzmarkierten Mutanten der HIV-1 RT aufgeführt.

Tabelle 3.3-1: Im Rahmen dieser Arbeit in den Einzelmolekül-Experimenten verwendeten fluoreszenzmarkierten HIV-1 RT- Mutanten.

Fluoreszenzmarkierung in p66	Fluoreszenzmarkierung in p51
p66 ^(C38S, C280S, K287C-Alexa488) /6H-p51 ^(C280S)	p66 ^(C38S, C280S) /6H-p51 ^(C280S, K281C-Alexa488)

3.3.1 Bestimmung der Quantenausbeute von an RT gebundenem Alexa488

Bei der Ermittlung der Quantenausbeute eines an RT gebundenen Fluorophors vergleicht man die Fluoreszenz des an das Protein gebundenen Fluorophors mit der eines freien Fluorophors, dessen Quantenausbeute bekannt ist.

Zur Bestimmung der Quantenausbeute von an RT gebundenem Alexa488 wird die Absorption einer Lösung des markierten Proteins und die der Referenzlösung (Rhodamine 110 Reference Standard) in einer Küvette bestimmt, wobei die Absorption 0,05 OD nicht überschreiten sollte. Von den selben Lösungen werden dann je zwei Emissionsspektren angefertigt, eines mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 460$ nm und das andere mit $\lambda_{\text{ex}} = 496$ nm. Zur Bestimmung der Integrale der Spektren mit $\lambda_{\text{ex}} = 460$ nm werden diese auf das Maximum der Emission des Spektrums mit $\lambda_{\text{ex}} = 496$ nm extrapoliert. Die ermittelten Spektren müssen dann noch für die Absorptionswerte und entsprechende Pufferwerte korrigiert werden. Diese korrigierten Spektren, sind in Abbildung 3.3.1.1-1 dargestellt. Abschließend werden die Integrale der korrigierten Spektren ermittelt.

Die Quantenausbeute des an das Protein gebundenen Alexa 488 ergibt sich, z.B. für die RT-Mutante p66^(C38S, C280S, K287C-Alexa488)/6H-p51^(C280S), wie folgt:

$$\Phi_{\text{Alexa488}} = \frac{\int_{470\text{nm}}^{650\text{nm}} \text{Fluoreszenz von p66}^{\text{C38S, C280S, K287C-Alexa488}} / \text{p51[6H]}^{\text{C280S}}}{\int_{470\text{nm}}^{650\text{nm}} \text{Fluoreszenz von Rhodamin 110}} \cdot \Phi_{\text{Rhodamin 110}}$$

$$= \frac{34298}{97127} \cdot 0,95 = \underline{\underline{0,34}}$$

Die Quantenausbeuten aller in dieser Arbeit verwendeten fluoreszenzmarkierten RT-Mutanten sind in Tabelle 3.3.1.1-1 aufgeführt.

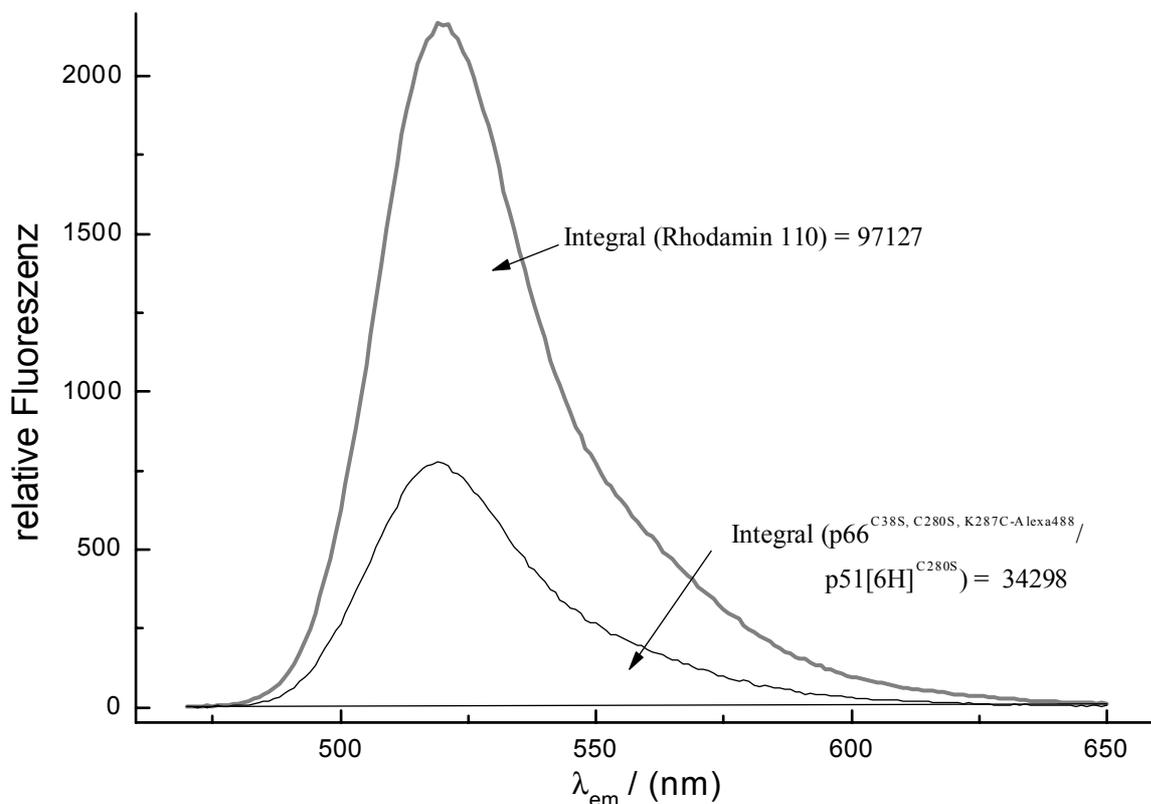


Abbildung 3.3.1.1-1: Extrapolierte Emissionsspektren von p66^(C38S, C280S, K287C-Alexa488)/6H-p51^(C280S) und Rhodamine 110 Reference Standard. Die Spektren wurden für Puffer korrigiert und auf gleiche Absorption normiert.

Tabelle 3.3.1.1-1: Quantenausbeuten von Alexa 488 an verschiedenen Positionen der RT.

fluoreszenzmarkierte RT-Mutante	Quantenausbeuten von Alexa 488
p66 ^(C38S, C280S, K287C-Alexa488) /6H-p51 ^(C280S)	0,34
p66 ^(C38S, C280S) /6H-p51 ^(C280S, K281C-Alexa488)	0,79

3.4 RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der RT-Mutanten im Vergleich zur HIV-1 Wildtyp RT

Um die Auswirkungen der Mutationen auf die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität zu analysieren, wurden die spezifischen Aktivitäten von HIV-1 Wildtyp RT und RT-Mutante parallel bestimmt (vgl. Kapitel 2.4.3). Hierzu wurde der Einbau von [³H]-markiertem dTTP in eine Poly(rA)-Matrize mit Oligo(dT)-Primern durch eine Flüssigszintillationszählung quantifiziert.

Zur Bestimmung der Aktivität initiiert man die Polymerasereaktion durch Zugabe einer RT-Lösung definierter Konzentration zu einer Pufferlösung, die den Primer/Matrizen-Komplex und das dTTP enthält. Nach 10 min Reaktion bei 37°C entnimmt man ein definiertes Volumen und gibt es auf ein DEAE-Papier. Nach dem Trocknen wird das Papier mit 2xSSC Puffer und Ethanol gewaschen und wiederum getrocknet. Anschließend wird die Radioaktivität durch eine Flüssigszintillationszählung ermittelt.

Die spezifische Aktivität ist wie folgt definiert:

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{min}}}{\text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{\text{min}}} \cdot \frac{n_{\text{dTTP}}}{m_{\text{RT}}}$$

$\text{cpm}_{\text{Probe}}$, cpm_{min} , und cpm_{max} sind die Zählwerte für die Probe, den Minimal- und den Maximalwert aus der Szintillationszählung des Aktivitätstests. n_{dTTP} ist die eingesetzte Stoffmenge an dTTP und m_{RT} die eingesetzte Masse an Reverser Transkriptase. Die Einheit der spezifischen Aktivität ist [nmol/(mg·10min)].

Die Meßwerte aus den Aktivitätstests und die daraus berechneten spezifischen Aktivitäten sind in Tabelle 3.4-1 aufgeführt. Die Abbildung 3.4-1 stellt vergleichend die spezifischen Aktivitäten von RT-Mutanten, fluoreszenzmarkierten RT-Mutanten und Wildtyp RT dar. Mit Ausnahme der Mutanten p66^(C38S, T69C, C280S)/6H-p51^(C280S) und p66^(C38S, W24C-Alexa488, C280S)/6H-p51^(C280S) zeigen alle unmarkierten und markierten RT-Mutanten eine spezifische Aktivität, die zwischen 70% und 129% der Aktivität der Wildtyp-RT (53554 nmol/(mg·10min) = 100%) entspricht. Die Mutante p66^(C38S, T69C, C280S)/6H-p51^(C280S) weist in eine spezifische Aktivität von 173% der Wildtyp-RT-Aktivität auf.

Tabelle 3.4-1: Vergleich der spezifischen Aktivität von Wildtyp RT und RT-Mutanten. Die Spezifische Aktivität des Wildtyp-Enzyms betrug 53554 [nmol/(mg·10min)] und wurde gleich 100% gesetzt.

Enzym	Spezifische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp
HIV-1 Wildtyp RT	100%
p66 ^(C38S, T69C, C280S) /6H-p51 ^(C280S)	173%
p66 ^(C38S, T69C-5-AF, C280S) / 6H-p51 ^(C280S)	96%
p66 ^(C38S, C280S, K287C) / 6H-p51 ^(C280S)	129%
p66 ^(C38S, C280S, K287C-5-Eosin) /6H-p51 ^(C280S)	120%
p66 ^(C38S, T69C, C280S, K287C) / 6H-p51 ^(C280S)	110%
p66 ^(C38S, W24C, C280S) / 6H-p51 ^(C280S)	80%
p66 ^(C38S, W24C-Alexa488, C280S) / 6H-p51 ^(C280S)	48%
p66 ^(C38S, C280S) / 6H-p51 ^(C280S, K281C)	70%
p66 ^(C38S, C280S) / 6H-p51 ^(C280S, K281C-Alexa488)	68%

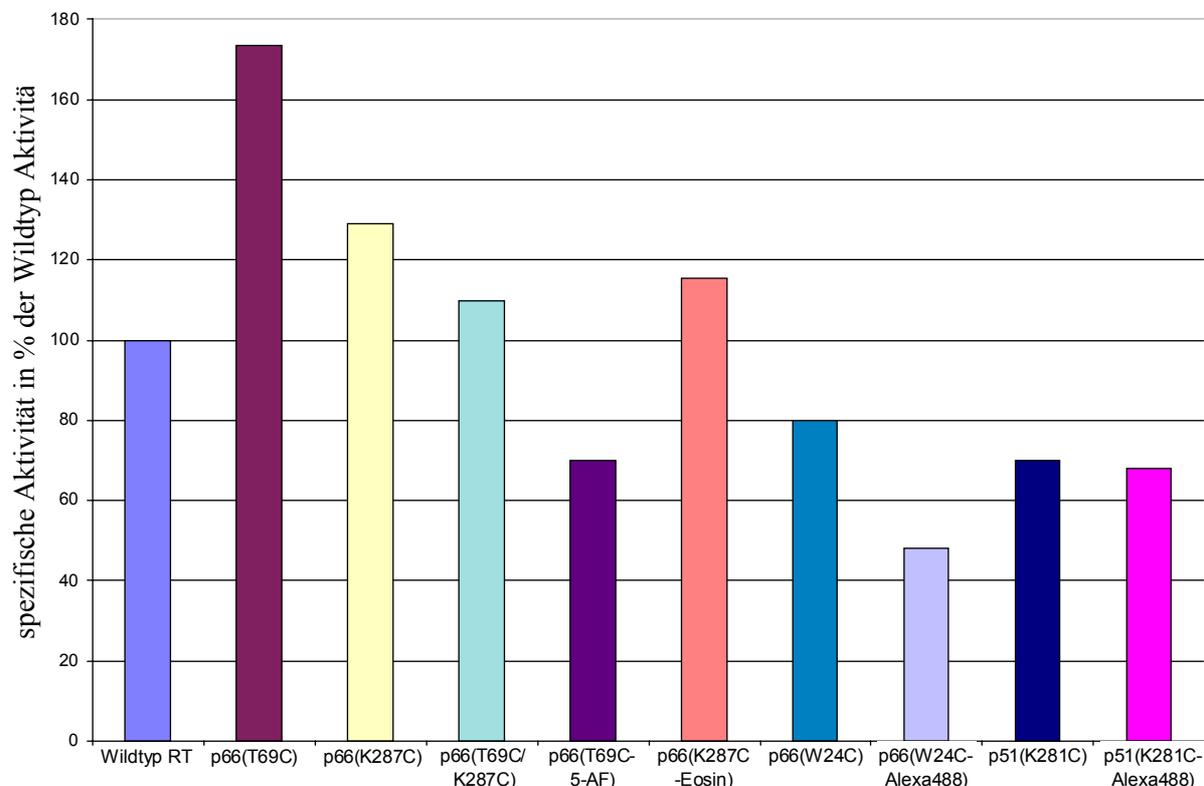


Abbildung 3.4-1: Spezifische Aktivität von HIV-1 Wildtyp RT, RT-Mutanten und fluoreszenzmarkierten RT-Mutanten. Die Spezifische Aktivität des Wildtyp-Enzyms wurde gleich 100% gesetzt. 5-AF steht für 5-Acetamidofluorescein.

3.5 Dissoziationsgleichgewichtskonstanten und Dissoziationskonstanten von RT-Primer/Matrize Komplexen

3.5.1 Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (k_D) von RT-Primer/Matrize Komplexen

Zur Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten von RT-Primer/Matrize Komplexen wurde eine mit FAM markierte Primer/Matrize mit Wildtyp RT und der RT-Mutante RT^(W24C, K287C) titriert (vgl. 2.4.2.1.1). Die Fluoreszenzänderung des Alexa488 wurde als Signal für die Bindung von RT an den Komplex verwendet.

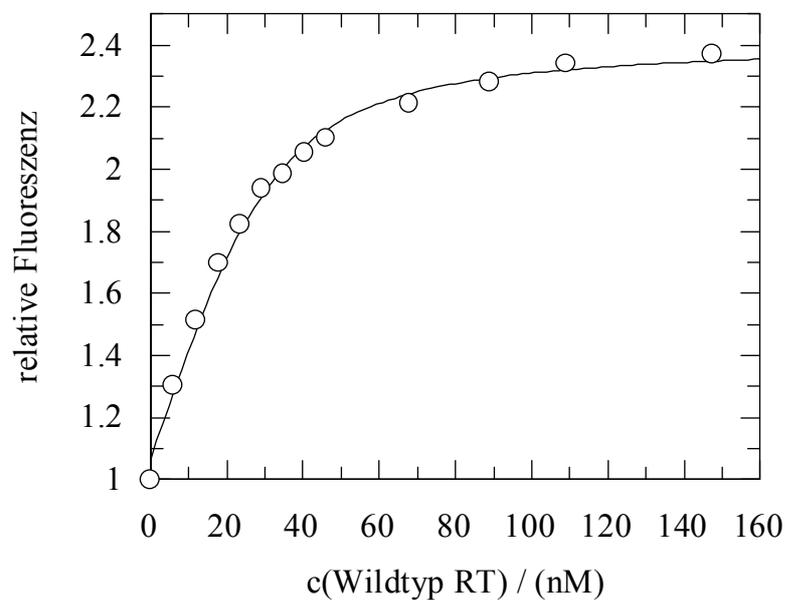


Abbildung 3.5.1-1: Titration der FAM-markierten Primer/Matrize mit HIV-1 Wildtyp RT.

In Abbildung 3.5.1-1 ist die Titrationskurve von HIV-1 Wildtyp RT mit einer Primer/Matrize dargestellt. An die gemessenen Datenpunkte (o) wurde mit Hilfe eines Computerprogramms eine Kurve (—) angepaßt, die sich als Lösung der Gleichung (2.4.2.1.2-1) ergibt. Die zu der Lösung der Gleichung gehörende Dissoziationskonstante k_D hat für den Komplex aus HIV-1 Wildtyp RT und Primer/Matrize den Wert $k_D = 3,5 \pm 1,1$ nM. Aus der Titrationskurve in Abbildung 3.5.1-2 ergibt sich analog zur Abbildung 3.5.1-1 die Dissoziationsgleichgewichtskonstante für den Komplex aus RT^(W24C, K287C) und Primer/Matrize zu $k_D = 6,0 \pm 1,1$ nM.

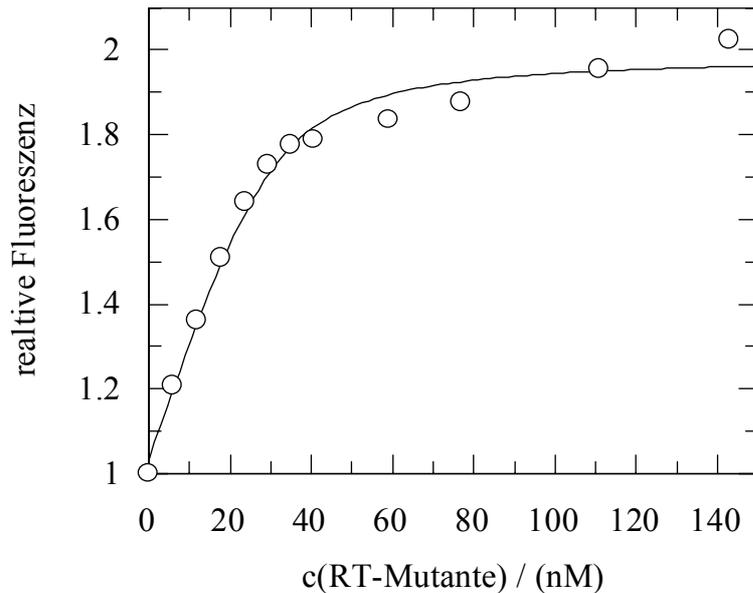


Abbildung 3.5.1-1: Titration der FAM-markierten Primer/Matrize mit RT^(W24C, K287C).

3.5.2 Dissoziationskonstanten (k_{off}) von RT-Primer/Matrize Komplexen

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten von RT-Primer/Matrize Komplexen ist besonders für die Einzelmolekülspektroskopie wichtig, da dort in einem Konzentrationsbereich (≈ 50 pM) gemessen wird, in dem die Reassoziierung eines zerfallenen Komplexes nicht mehr entscheidend zur Konzentration des RT-Primer/Matrize Komplexes beiträgt. Bei Meßzeiten von mehr als 30 min ist es von großer Bedeutung das der beobachtete RT-Primer/Matrize Komplex eine möglichst große Halbwertszeit besitzt, da sich durch stark sinkende Komplexkonzentration die Meßzeiten erheblich verlängert. Die Dissoziationskonstanten wurden wie in Kapitel 2.4.2.1.3 beschrieben durch Verdrängungsexperimente bestimmt.

3.5.2.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Stopped-Flow ($k_{\text{off}} > 0,01$ s⁻¹)

Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten des RT-Primer/Matrize Komplexes p66^(C38S, C280S)/6H-p51^(C280S, K281C-Alexa488)-2HMI16/36Cy5-3' wurde der Komplex in der Spritze A des Stopped-Flow-Gerätes und die verdrängende doppelsträngige DNA Flo1+4 in der Spritze B vorgelegt. Nach zusammenschießen der beiden Lösungen wurde die Fluoreszenzintensität aufgezeichnet.

Es wurden verschiedene Messungen durchgeführt, wobei die Salzkonzentration im Puffer variiert wurde. Zusätzlich wurden auch Experimente mit dem nicht-nukleosidischen RT-Inhibitor BI-RG 587 durchgeführt, der vor dem Mischen mit der verdrängenden DNA 2 min

mit dem RT-Primer/Matrize Komplex inkubiert wurde. Im folgenden sind die Bedingungen für jedes Verdrängungsexperimente jeweils in einer Tabelle aufgeführt. Daran anschließend sind die aufgezeichneten Meßkurven und Analysen dargestellt. Der Parameter $t_{1/2}$ wurde durch ablesen aus dem Graphen ermittelt und gibt an zu welchem Zeitpunkt, nach Start des Experiments, die Fluoreszenz auf 50% des Startwertes abgesunken ist.

a) 80 mM KCl

Spritze A	Spritze B	Puffer
80 nM p66 ^(C38S, C280S) /6H-p51 ^(C280S, K281C-Alexa488)	24 μ M Flo1+4	RT-salt (80 mM KCl)
240 nM 2HMI16/36Cy5-3'		

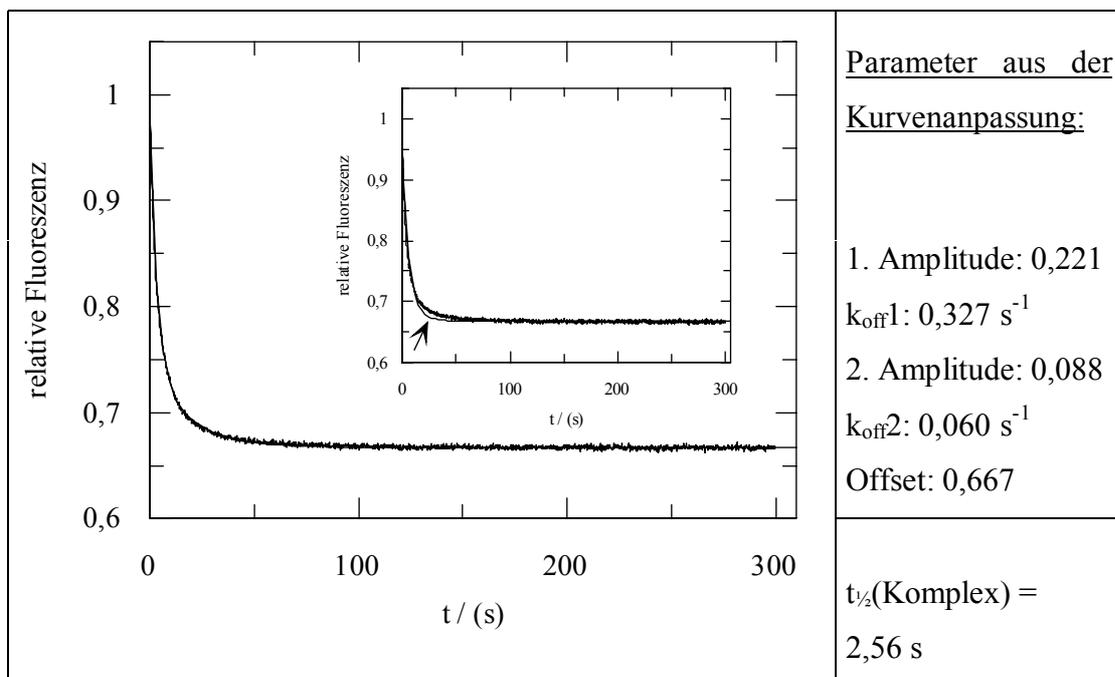


Abbildung 3.5.2.1-a: Verdrängung von 2HMI16/36Cy5-3' aus p66^(C38S, C280S)/6H-p51^(C280S, K281C-Alexa488)-2HMI16/36Cy5-3' durch Flo1+4, in RT-salt mit 80 mM KCl. Die Meßdaten lassen sich an eine zweifach-exponentielle Gleichung (—) anpassen. Eingefügtes Diagramm: Die Anpassung der Meßdaten an eine einfach exponentielle Gleichung zeigt deutlich Abweichungen der gerechneten Kurve von den Meßdaten.

Die Anpassung aller Meßkurven aus den Verdrängungsexperimenten gelingt am besten wenn man einen zweifach-exponentiellen Kurvenverlauf annimmt. Die Anpassung an eine einfach-exponentielle Gleichung zeigt dahingegen deutliche Abweichungen des gerechneten Kurvenverlaufs vom experimentell ermittelten (vgl. Abb. 3.5.2.1-a, kleines Diagramm).

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Dissoziation des RT-Primer/Matrize Komplexes entweder ein zweistufiger Prozeß ist oder das die beiden Dissoziationskonstanten die Dissoziation zweier unterschiedlicher Komplexe reflektieren. Für eine KCl-Konzentration von 80 mM hat die schnellere Phase der Dissoziation einen Wert von $0,327 \text{ s}^{-1}$, die langsamer beträgt $0,060 \text{ s}^{-1}$. Die mittlere Halbwertszeit des Komplexes beträgt 2,56 s.

b) 10 mM KCl

Spritze A	Spritze B	Puffer
40 nM p66 ^(C38S, C280S) /6H-p51 ^(C280S, K281C-Alexa488)	12 μM Flo1+4	RT-salt (10 mM KCl)
120 nM 2HMI16/36Cy5-3'		

Führt man das Verdrängungsexperiment dahingegen in Puffer mit 10 mM KCl (vgl. Abb. 3.5.2.1-b) durch, so verlangsamen sich beide Raten ungefähr um den Faktor 20. $k_{\text{off}1}$ beträgt dann $0,017 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}2}$ $0,003 \text{ s}^{-1}$ und die Halbwertszeit des Komplexes verlängert sich auf 156 s, also um den Faktor 60.

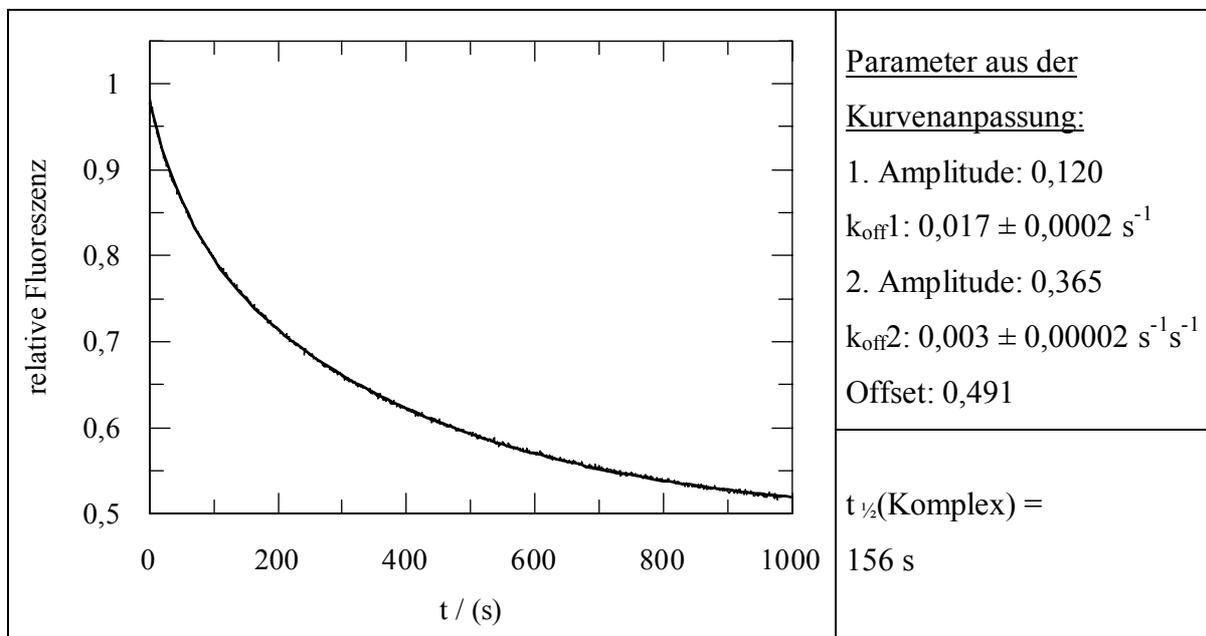


Abbildung 3.5.2.1-b: Verdrängung von 2HMI16/36Cy5-3' aus p66^(C38S, C280S)/ 6H-p51^(C280S, K281C-Alexa488)-2HMI16/36Cy5-3' durch Flo1+4, in RT-salt mit 10 mM KCl.

c) 80 mM KCl / BIRG 587

Spritze A	Spritze B	Puffer
40 nM p66 ^(C38S, C280S) /6H-p51 ^(C280S, K281C-Alexa488)	12 μ M Flo1+4	RT-salt (80 mM KCl)
120 nM 2HMI16/36Cy5-3'		
200 nM BIRG 587		

Die Analyse der Dissoziationskonstanten eines RT-Primer/Matrize Komplexes, an den der nicht-nukleosidische RT-Inhibitor BI-RG 587 gebunden ist (Abbildung 3.5.2.1-c), zeigt daß die Bindung des Inhibitors ebenfalls den Zerfall des Komplexes verlangsamt. Ein 5-facher molarer Überschuß an Inhibitor über Protein bewirkt eine 4-fache Erniedrigung der Raten auf $0,085 \text{ s}^{-1}$ ($k_{\text{off}1}$) und $0,016 \text{ s}^{-1}$ ($k_{\text{off}2}$). Die Halbwertszeit des Komplexes erhöht sich im Vergleich zum Komplex ohne BI-RG 587 auf 18,4 s.

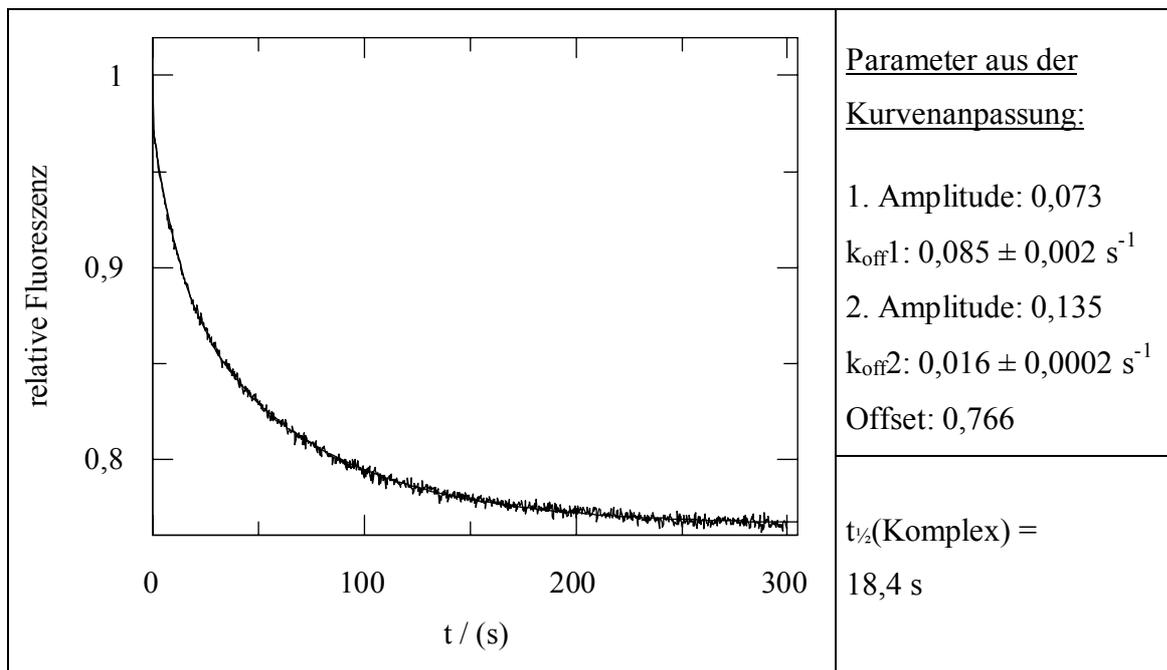


Abbildung 3.5.2.1-c: Verdrängung von 2HMI16/36Cy5-3' aus p66^(C38S, C280S)/6H-p51^(C280S, K281C-Alexa488)-2HMI16/36Cy5-3'-BI-RG 587 durch Flo1+4, in RT-salt mit 80 mM KCl.

Da das Zeitfenster des Stopped-Flow Gerätes auf 1000 s begrenzt ist wurde Messung mit 10 mM KCl und BIRG 587, wie im nächsten Abschnitt folgt, in einem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt.

3.5.2.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten im Fluoreszenzspektrometer ($k_{\text{off}} < 0,01 \text{ s}^{-1}$)

Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten des RT-Primer/Matrize Komplexes $p66^{(C38S, C280S)}/6H-p51^{(C280S, K281C-Alexa488)}$ -2HMI16/36Cy5-3' im Fluoreszenzspektrometer wurde der Komplex zusammen mit dem nicht-nukleosidischen RT-Inhibitor BI-RG 587 in einer Küvette vorgelegt und die verdrängende DNA, Flo1+4, vor dem Start der Messung zugegeben. Auch hier diente die Fluoreszenz des an die RT gebundenen Alexa488 als Maß für die Verdrängung der Cy5-markierten Nukleinsäure. Wird diese durch unmarkierte DNA (Flo1+4) ersetzt steigt die Fluoreszenz des Alexa488 an, da keine Energie mehr auf das Cy5 übertragen werden kann. Der Parameter $t_{1/2}$ wurde wie in 3.5.2.1 ermittelt.

d) 10 mM KCl / BIRG 587

In der Küvette vorgelegte Lösung	Zugabe vor Start der Messung	Puffer
33 nM $p66^{(C38S, C280S)}/6H-p51^{(C280S, K281C-Alexa488)}$	10 μM Flo1+4	RT-salt (10 mM KCl)
100 nM 2HMI16/36Cy5-3'		
167 nM BIRG 587		

Die Verdrängung der DNA aus einem RT-DNA Komplex, an den zusätzlich der nicht-nukleosidische RT-Inhibitor BI-RG 587 gebunden ist, wird durch Erniedrigung der Salzkonzentration von 80 mM auf 10 mM KCl ebenfalls verlangsamt. Hierbei multiplizieren sich die Einflüsse von Inhibitor und Salzkonzentration (vgl. Abbildung 3.5.2.2-d). Die Dissoziationskonstanten $k_{\text{off}1}$ und $k_{\text{off}2}$ wurden zu $0,002 \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{\text{off}2}$: $0,0005 \text{ s}^{-1}$ bestimmt und sind damit 120-fach langsamer als die Raten die im Verdrängungsexperiment ohne Inhibitor und mit 80 mM KCl ermittelt wurden. Die Halbwertszeit des Komplexes verlängert sich um das 300-fache, auf 768 s.

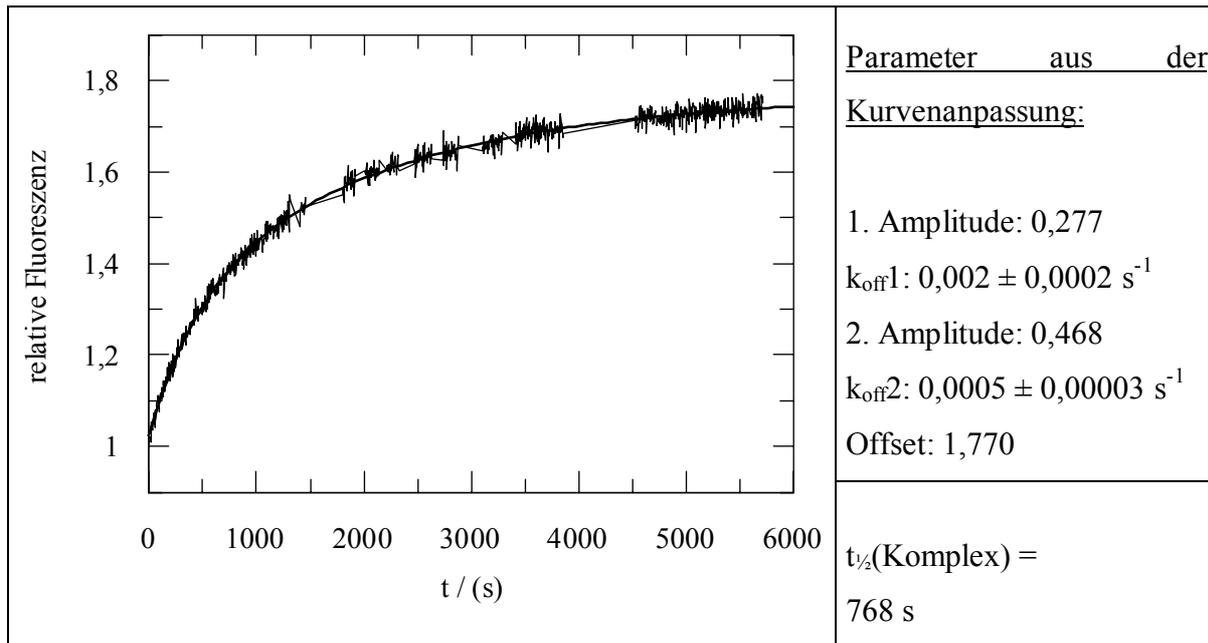


Abbildung 3.5.2.2-d: Verdrängung von 2HMI16/36Cy5-3' aus p66^(C38S, C280S)/6H-p51^(C280S, K281C-Alexa488)-2HMI16/36Cy5-3'-BI-RG 587 durch Flo1+4, in RT-salt mit 10 mM KCl.

3.6 Analyse der Konformation von HIV-1 RT mittels ESR-Spektroskopie

Röntgen-Kristallstruktur-Analysen von komplexierter und ligandenfreier HIV-1 RT zeigen, daß das Enzym verschiedene Konformationen annehmen kann, die sich im wesentlichen in der Orientierung der Daumen-Domäne von p66 unterscheiden. Es existieren Kristallstrukturen von ligandenfreier und mit dsDNA komplexierter RT^[27,77]. Desweiteren wurde die Kristallstruktur von HIV-1 RT im Komplex mit einem pseudoknot-RNA-Inhibitor bestimmt^[29]. Aufgrund der Orientierung der Daumen-Domäne unterscheidet man zwei Konformationen. In der geschlossenen Konformation, die in der Kristallstruktur des ligandenfreien und an pseudoknot-RNA gebundenen Enzyms vorliegt, sind die Spitzen der Daumen- und der Fingerdomäne sehr nah zusammen. Dem gegenüber entfernt sich die Daumen-Domäne in der Kristallstruktur des mit dsDNA komplexierten Enzyms etwa 25 Å von der Finger-Domäne, was in der einer offenen Konformation resultiert.

Eine Überlagerung der Struktur freier RT mit der mit dsDNA komplexierten RT (vgl. Abbildung 1.5-2) veranschaulicht die 30° - 40° Bewegung der Daumen-Domäne relativ zur Handflächen-Domäne bei der Bindung der Nukleinsäure.

Um die Konformationen verschiedener RT-Komplexe in Lösung zu charakterisieren und die Ergebnisse mit den Röntgen-Kristallstruktur-Analysen zu vergleichen, wurden mit Hilfe der ESR-Spektroskopie Abstandsbestimmungen zwischen der Finger- und Daumen-Domäne

durchgeführt. Speziell wurde die dipolare Wechselwirkung zweier an das Enzym gebundener Spinsonden ausgenutzt. Die Intensität der Wechselwirkung zweier Spinsonden hat einen Einfluß auf die Form ihrer ESR-Spektren und ermöglicht so eine Quantifizierung ihres Abstandes. Allerdings beschränkt sich diese Wechselwirkung auf einen Abstand von maximal 25 Å^[37]. Daher müssen die Spinsonden so in das Protein eingeführt werden, daß ihr Abstand kleiner als 25 Å ist. Zwei Positionen, die dieses Kriterium erfüllen, sind Trp24 (Finger-Domäne) und Lys287 (Daumen-Domäne) der p66-Untereinheit (vgl. Abbildung 1.5-2). Die C_β-Atome dieser Aminosäuren haben in der Kristallstruktur des freien Enzyms einen Abstand von 12 Å und sind im RT-DNA Komplex 30 Å voneinander entfernt. Um spezifisch die Positionen 24 und 287 in p66 mit Spinsonden zu markieren wurden Trp24 und Lys287 in p66 durch Cysteine ersetzt, wohingegen die natürlichen, Lösungsmittel-zugänglichen Cys38 in p66 und 280 in p66 und p51 durch Serine ersetzt wurden. Die neu eingeführten Cysteine wurden dann mit der Spinsonde MTSL-¹⁵N-d₁₅ (R1) markiert (vgl. 2.2.4). Dadurch erhält man die spinmarkierte RT-Mutante p66^(W24C-MTSL-Nd, C38S, C280S, K287C-MTSL-Nd)/6H-p51^(C280S) (diese RT wird im Folgenden als RT^(W24C-R1, K287C-R1) bezeichnet).

3.6.1 Konformation der Komplexe von HIV-1 RT-Mutanten in gefrorener Lösung

ESR-Spektren von freier RT und RT gebunden an eine 18/36mer DNA/DNA sowie an den pseudoknot-RNA-Inhibitor wurden bei 170 K gemessen, um die Absolutwerte der Abstände der Spinsonden in der spinmarkierten RT zu bestimmen (Abbildung 3.6.1-1). Bei dieser Temperatur sind dynamische Effekte der Spinsonden ausgeschlossen und die Spektren können als Pulverspektren betrachtet werden (vgl. 2.5.1.4).

Das ESR-Spektrum der einfach markierten Mutante RT^(W24C-R1) kann als wechselwirkungsfreies Referenzspektrum betrachtet werden. Vergleicht man dieses Spektrum mit dem der RT^(W24C-R1, K287C-R1) im Komplex mit DNA/DNA, so zeigt das Spektrum des Komplexes eine leichte Verbreiterung der Absorptionslinien, was mit einer geringeren Amplitude einher geht. Die Linienform des Spektrums der ligandenfreien Mutante RT^(W24C-R1, K287C-R1) ist annähernd identisch mit der des DNA/DNA Komplexes. Daher sollten auch die Abstände der Spinsonden in der Daumen- und Finger-Domäne ähnlich sein. Durch Anpassung simulierter Pulverspektren an die gemessenen Spektren (vgl. 2.5.1.4), erhält man für den RT-dsDNA Komplex einen mittleren Abstand der Spinsonden von 19 Å. Für die ligandenfreie RT beträgt der mittlere Abstand 18 Å. Hierbei variiert die Verteilungsbreite σ zwischen 5 Å und 7 Å. In den Kristallstrukturen von HIV-1 RT im Komplex mit DNA/DNA^[77] wird die Daumen-Domäne der p66-Untereinheit durch die gebundene

Nukleinsäure in einer offenen Konformation fixiert, in der der Abstand der C_{β} -Atome von W24 und K287 $29 \text{ \AA}^{[77]}$ bzw. $35 \text{ \AA}^{[26]}$ beträgt. Will man die aus den ESR-Messungen erhaltenen Abstände mit denen in der Kristallstruktur vergleichen, muß man zwei Punkte berücksichtigen. Erstens resultieren die aus den ESR-Spektren ermittelten Abstände aus der Wechselwirkung der Elektronen in den π -Orbitalen der Stickstoffatome der Nitroxid-Gruppen. Zweitens sind die Nitroxid-Gruppen über einen Linker mit einer Länge von ca. 7 \AA an die Cysteinreste gebunden. Nimmt man beide Faktoren zusammen, so stimmen die aus den ESR-Spektren ermittelten Abstände gut mit denen in der Kristallstruktur überein. Daraus folgt, daß in gefrorener Lösung, sowohl der RT-dsDNA Komplex als auch die ligandenfreie RT in der offenen Konformation vorliegt. Schockgefrieren der Probe der ligandenfreien RT von 273 K auf 170 K hat keine Auswirkung auf die Linienform des ESR-Spektrums.

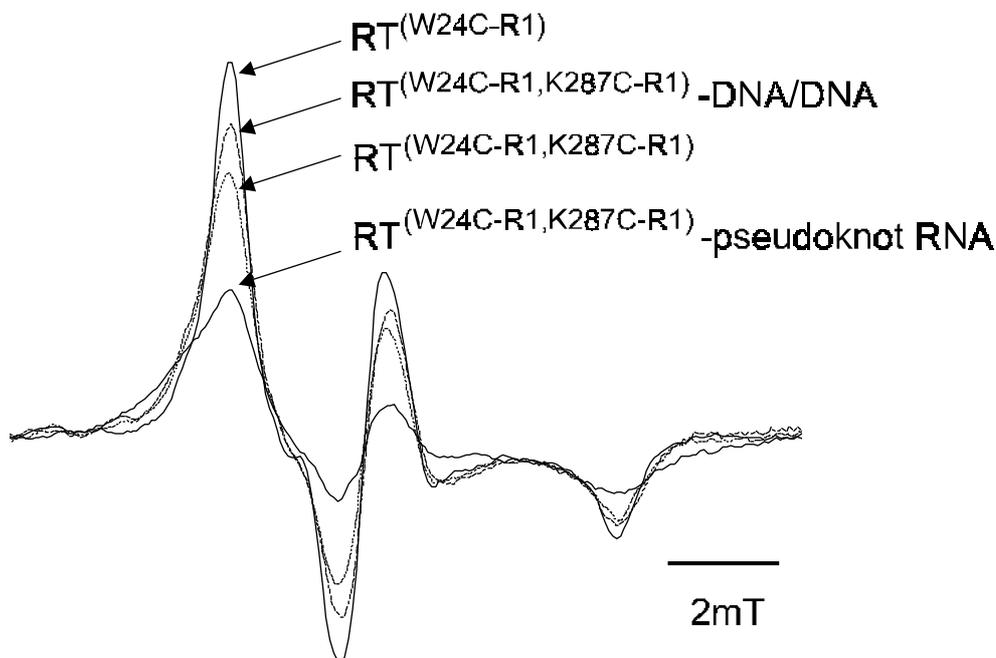


Abbildung 3.6.1-1: ESR –Spektren von einfach und doppelt spinmarkierter HIV-1 RT bei 170 K . Die Spektren sind auf gleiche Spinzahl normiert. Das Spektrum der einfach markierten Mutante $RT^{(W24C-R1)}$ stellt ein wechselwirkungsfreies Referenzspektrum dar. Aus der mathematischen Anpassung der Spektren der doppelt markierten RT-Mutante ergaben folgende Abstände zwischen den Spinsonden: $RT^{(W24C-R1, K287C-R1)} - \text{DNA/DNA}$: $>19 \text{ \AA}$; $RT^{(W24C-R1, K287C-R1)}$: 18 \AA ; $RT^{(W24C-R1, K287C-R1)} - \text{pseudoknot-RNA}$: $11,5 \text{ \AA}$.

Betrachtet man das ESR-Spektrum des RT-pseudoknot-RNA Komplexes, so erkennt man eine extreme Linienverbreiterung sowie eine erheblich reduzierte Amplitude. Diese Linienform ist auf starke dipolare Wechselwirkung der Spinsonden zurückzuführen. Der mittlere Abstand der Spinsonden, der durch Anpassen simulierter Spektren ermittelt werden konnte, beträgt

11,5 Å. In der Kristallstruktur des Komplexes sind die C_β-Atome von W24 und K287 11,9 Å voneinander entfernt^[29].

Ein genauere Vergleich der experimentellen Daten mit der Kristallstruktur wird durch eine Analyse der Lage der Nitroxid-Gruppen möglich. Hierzu wurden Molekulardynamik-Simulationen an der Kristallstruktur des RT-pseudoknot-RNA Komplexes^[29] nach der Methode von Steinhoff *et al.* durchgeführt^[37,57]. Während der Simulation waren die Aminosäure-Reste 20-28 und 284-290 aus p66 frei beweglich, alle anderen Reste wurden festgehalten. Eine Analyse der Nitroxid-Trajektorien einer 4 ns dauernden Simulation (Abbildung 3.6.1-2) liefert einen mittleren Abstand der Spinsonden von 10 Å ($\sigma = 3$ Å). Die simulierten Abstände und Verteilungsbreiten sind damit etwas kleiner als die Werte, die für die gefrorene Lösung ermittelt wurden. Diese Diskrepanz deutet auf eine geringe Flexibilität der Finger- und Daumen-Domäne in p66 hin, die in der Simulation nicht berücksichtigt wurde.

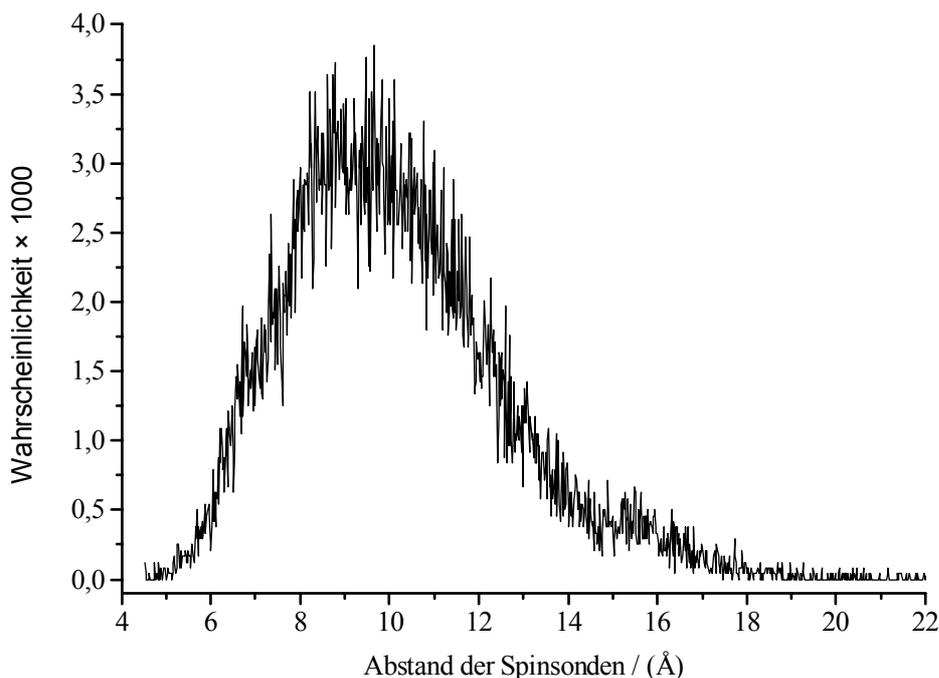


Abbildung 3.6.1-2: Auswertung der Trajektorien einer 4 ns Molekulardynamik Simulation der Kristallstruktur von HIV-1 RT im Komplex mit einem pseudoknot-RNA-Inhibitor^[29]. Während der Simulation waren die Aminosäure-Reste 20-28 und 284-290 in p66 frei beweglich, alle anderen Reste wurden festgehalten. Das Diagramm zeigt die Wahrscheinlichkeitsverteilung des Abstandes der Stickstoffatome der beiden Spinsonden während der Simulation. Der mittlere Abstand beträgt 10 Å, die Verteilungsbreite (σ) 3 Å.

3.6.2 Konformation der Komplexe von HIV-1 RT-Mutanten in Lösung (T = 294 K)

3.6.2.1 Eigenschaften der einfach spinmarkierten HIV-1 RT-Mutanten

Bei Raumtemperatur (T = 294 K) findet die Bewegung der Spinsonde im ns-Bereich statt. Daher hat die Mobilität der Nitroxid-Gruppen sowie die Flexibilität ihrer Bindestellen einen direkten Einfluß auf die Form der ESR-Absorptionslinie.

Um den Einfluß der Liganden auf die Linienform der Signale der Spinsonden an den einzelnen Positionen (Cys24 und Cys287 in p66) zu überprüfen, wurden ESR-Spektren der einfach spinmarkierten RT Mutanten RT^(W24C-R1) und RT^(K287C-R1) aufgenommen (Abbildung 3.6.2.1-1). Es wurden Spektren für die freie RT, den RT-dsDNA Komplex und den pseudoknot-RNA Komplex aufgenommen.

Alle für die Mutante RT^(W24C-R1) aufgenommenen Spektren haben eine identische Linienform (Abbildung 3.6.2.1-1 A). Daraus folgt, daß weder die 18/36mer DNA/DNA, noch die pseudoknot-RNA signifikant mit der an das Cys24 gebundenen Spinsonde wechselwirken. Damit hat auch die Konformationsänderung der RT, von der offenen (RT-DNA/DNA Komplex) zur geschlossenen Form (RT-pseudoknot-RNA Komplex), keinen Einfluß auf die Wechselwirkung der Spinsonde mit der Sekundär- oder Tertiärstruktur des Proteins.

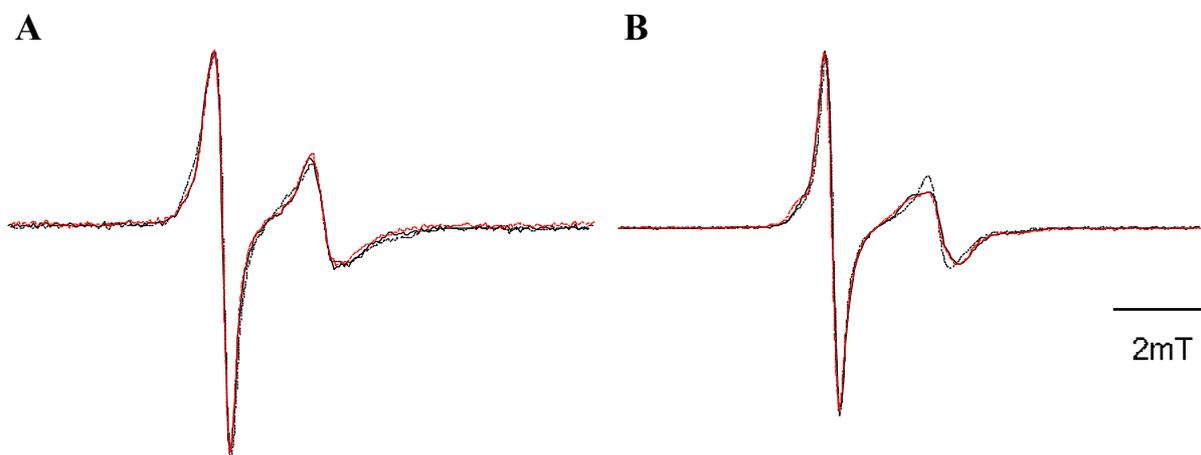


Abbildung 3.6.2.1-1: Raumtemperatur-ESR-Spektren (294 K) der einfach spinmarkierten RT Mutanten RT^(W24C-R1) (A) und RT^(K287C-R1) (B). Die Spektren der ligandenfreien RT (—), des dsDNA Komplexes (····) und des pseudoknot-RNA Komplexes (---) sind auf gleiche Amplitude normiert.

Im Fall der Mutante RT^(K287C-R1) zeigt sich ein etwas anderes Bild (Abbildung 3.6.2.1-1 B). Die Spektren für die freie RT und den RT-pseudoknot-RNA Komplex sind identisch, wohingegen die Mobilität der Spinsonde im RT-DNA/DNA Komplex leicht erhöht ist. Hier sinkt die Rotationskorrelationszeit um 25% auf 1,3 ns (siehe Tabelle 3.6.2.1-1), was zu einer

geringen Linienbreite und leicht vergrößerter Amplitude führt. Für alle anderen Proben der einfach markierten RT-Mutanten $RT^{(K287C-R1)}$ und $RT^{(W24C-R1)}$ wurden Rotationskorrelationszeiten zwischen 1,6 und 1,9 ns bestimmt (vgl. 2.5.1.4). Damit sind alle für die Spinsonden ermittelten Rotationskorrelationszeiten und damit deren Mobilitäten in einer Größenordnung, die man für Spinsonden, die an Schleifenregionen eines Proteins gebunden sind, erwarten würde^[78,79].

Tabelle 3.6.2.1-1: Rotationskorrelationszeiten der einfach spinmarkierten RT-Mutanten $RT^{(W24C-R1)}$ und $RT^{(K287C-R1)}$ und ihrer dsDNA sowie pseudoknot-RNA Komplexe bei 294 K.

Enzym / Komplex	τ_R / (ns)
$RT^{(W24C-R1)}$	1,57
$RT^{(K287C-R1)}$	1,85
$RT^{(W24C-R1)}$ -DNA/DNA	1,78
$RT^{(K287C-R1)}$ -DNA/DNA	1,36
$RT^{(W24C-R1)}$ -pseudoknot-RNA	1,55
$RT^{(K287C-R1)}$ -pseudoknot-RNA	1,83

3.6.2.2 Konformation der ligandenfreien und komplexierten HIV-1 RT-Mutante

$RT^{(W24C-R1, K287C-R1)}$

In Abbildung 3.6.2.2-1 sind die ESR Spektren der zweifach spinmarkierten RT-Mutante $RT^{(W24C-R1, K287C-R1)}$ dargestellt. Vergleichend sind 1:1-Superpositionen (Mischspektren) der entsprechenden einfach markierten Mutanten $RT^{(W24C-R1)}$ und $RT^{(K287C-R1)}$ dargestellt.

Das Spektrum der mit dsDNA komplexierten, zweifach markierten RT ist weitgehend identisch mit den Spektren des einfach markierten Enzyms (Abbildung 3.6.2.2-1 A). Die leichten Abweichungen im Hochfeld-Bereich des Spektrums sind auf einen geringen Anteil an einfach markiertem Enzym zurückzuführen. Da die Spektren nahezu identisch sind, ist in der zweifach markierten Probe keine Wechselwirkung zwischen den Spinsonden zu erkennen, weshalb der Abstand der Spinsonden mindesten 25 Å betragen muß. Die Konformation des RT-Komplexes ist demnach offen.

Die Spektren der ligandenfreien (Abbildung 3.6.2.2-1 B) und der an pseudoknot-RNA (Abbildung 3.6.2.2-1 C) gebundenen RT weisen beide eine dominante Komponente auf, die im Vergleich zu der Superposition der Spektren der einfach markierten RT deutlich

verbreitert ist. Durch doppelte Integration erhält man die Anteile der verbreiterten Komponente am Gesamtspektrum. Der Anteil der verbreiterten Komponente beträgt 80% für den RT-pseudoknot-RNA Komplex und 70% im Spektrum der freien RT. Durch Spektrensimulation kann ausgeschlossen werden, daß die Linienverbreiterung von einer weiteren Bewegungseinschränkung der Spinsonden herrührt. Daher muß die verbreiterte Komponente durch Spin-Spin-Wechselwirkung zwischen den beiden am Enzym gebundenen Spinsonden hervorgerufen werden. Die Konvolution der Spektren der einfach markierten RT mit einer Lorenz-Verbreiterungsfunktion (vgl. 2.5.xx Raumtemperatur-Messungen) ergibt eine Verbreiterung des Spektrums der zweifach markierten RT von 6,5 G.

Um den Abstand der Spinsonden in doppelt spinmarkierter RT zu bestimmen, müssen einige Annahmen getroffen werden (vgl. 2.5.1.4). Eine Annahme ist, daß die Rotationskorrelationszeit des Vektors zwischen den Spinsonden der des Proteins entspricht und damit ca. 50 ns (in Wasser, bei Raumtemperatur) beträgt. Dann mitteln sich statische dipolare Wechselwirkungen der Spinsonden ab einem Abstand größer 30 Å aus. Dem zufolge sollten statische dipolare Verbreiterungen die ESR-Spektren für Abstände kleiner 20 Å und Temperaturen kleiner als Raumtemperatur dominieren. Simulationen von dipolar verbreiterten Spektren zeigen eine Übereinstimmung mit der breiten Komponente der experimentell ermittelten Linienform des Spektrums der an pseudoknot-RNA gebundenen RT im Bereich von Interspinabständen zwischen 11 Å bei 272 K und 14 Å bei 313 K.

Die Verringerung der Linienbreite mit zunehmender Temperatur ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß Austauschwechselwirkungen nicht signifikant zur Linienverbreiterung beitragen. Vielmehr deutet es darauf hin, daß der Abstand der Spinsonden durch ihre Bewegung moduliert wird, wodurch sich bei höheren Temperaturen die dipolaren Wechselwirkungen ausmitteln, was zu einer scheinbaren Vergrößerung des Interspinabstandes führen kann^[80]. Berücksichtigt man dies, so sind die durch die Simulation ermittelten Abstände in guter Übereinstimmung mit dem in der gefrorenen Lösung ermittelten Abstand von 11,5 Å, was zeigt, daß die RT im Komplex mit der pseudoknot-RNA bei Raumtemperatur eine geschlossenen Konformation annimmt.

In Abbildung 3.6.2.2-1 B ist ein Spektrum dargestellt, das man erhält, wenn man die Spektren des RT-pseudoknot-RNA Komplexes und des RT-dsDNA Komplexes im Verhältnis von 9:1 mischt. Dieses superponierte Spektrum ist fast identisch mit dem für die freie RT gemessenen Spektrum. Da das gemischte Spektrum zu 90% aus dem des RT-pseudoknot-RNA Komplexes besteht, sind die Spin-Spin-Wechselwirkungen in der freien RT nahezu identisch mit denen der RT im Komplex mit der pseudoknot-RNA. Daraus läßt sich ableiten, daß auch der

Abstand der Daumen- und Finger-Domäne und damit die Konformation in der freien RT sehr ähnlich sein muß wie im Komplex mit der pseudoknot-RNA. Damit liegen 90% des ligandenfreien Enzyms bei Raumtemperatur in einer geschlossenen Konformation vor. Dies

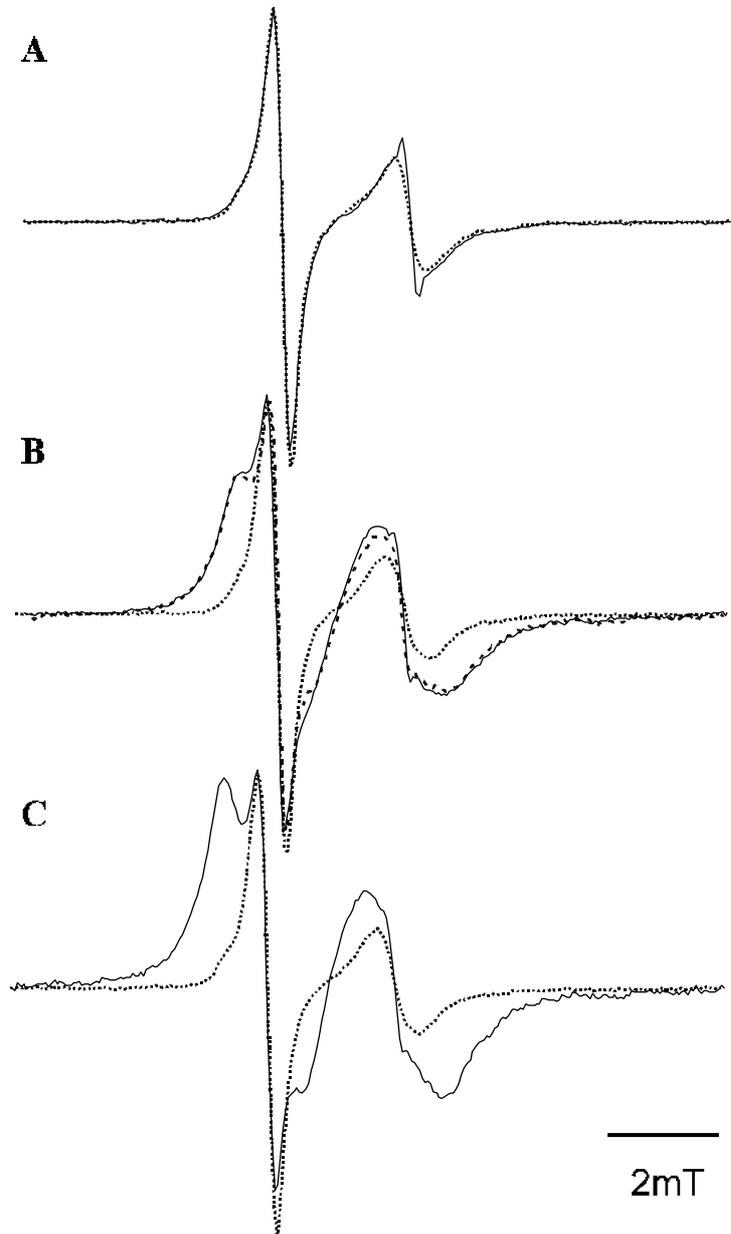


Abbildung 3.6.2.2-1: Raumtemperatur ESR Spektren (294 K) der zweifach spinmarkierten RT Mutante $RT^{(W24C-R1, K287C-R1)}$ (—) im Vergleich mit Superpositionen (1:1) der entsprechenden Spektren der einfach markierten RT Mutanten (....). Alle Spektren sind auf die gleiche Amplitude der Niedrigfeld-Linie normiert. (A) RT im Komplex mit dsDNA, (B) ligandenfreie RT, (C) RT im Komplex mit dem pseudoknot-RNA-Inhibitor. Die Linienform der Spektren der ligandenfreien und an pseudoknot-RNA gebundenen RT wird, im Vergleich zu den superponierten Spektren, durch eine zusätzliche breite Komponente dominiert. Eine Superposition der Spektren von an pseudoknot-RNA gebundener RT (Anteil: 90% der Spinzahl) und an dsDNA gebundener RT (10%) ist in B (---) dargestellt. Ihre Linienform stimmt mit der des für die zweifach markierte ligandenfreie RT gemessenen Spektrums überein.

steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Tieftemperatur-Messungen bei denen die ligandenfreie RT eine offene Konformation annimmt. Zusammen genommen legen beide Ergebnisse nahe, daß die Konformation der ligandenfreien HIV-1 RT temperaturabhängig ist. Daraufhin wurde die Temperaturabhängigkeit der Spektren untersucht. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel dargestellt.

3.6.2.3 Temperaturabhängigkeit der ESR-Spektren

Um zu überprüfen, ob die Konformation der Daumen-/Finger-Domäne der HIV-1 RT temperaturabhängig ist, wurde eine Reihe von ESR-Spektren der einfach und zweifach markierten ligandenfreien und komplexierten RT zwischen 272 K und 313 K aufgenommen (Abbildung 3.6.2.3-1). Für den RT-pseudoknot-RNA Komplex wurde der Anteil der wechselwirkenden Spezies durch Integration der Spektren bestimmt und betrug bei allen Präparationen zwischen 70% und 80% und variierte weniger als 5% in dem betrachteten Temperaturbereich. Der nicht wechselwirkende Anteil resultiert aus einer Markierungseffizienz von 85% - 90% (vgl. 2.2.4). Unter der Annahme, daß die Effizienz der Markierung für beide Positionen (Cys24 und Cys287) gleich ist, ergibt sich aus dem Quadrat der Markierungseffizienz die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer Spinsonde an beiden Positionen. Daher sollten 70% - 81% aller Moleküle Spin-Spin-Wechselwirkung zeigen, was mit den experimentellen Ergebnissen übereinstimmt.

Zur Analyse der Konformation der ligandenfreien RT konnte für jede Temperatur das Spektrum der freien RT durch eine Superposition der Spektren der RT-dsDNA- und RT-pseudoknot-RNA Komplexes dargestellt werden. Dies ist exemplarisch in Abbildung 3.6.2.2-1 B dargestellt. Dieses Ergebnis zeigt, daß der Anteil, der im Spektrum der ligandenfreien RT Spin-Spin-Wechselwirkung zeigt, eine Konformation annimmt, die der im RT-pseudoknot-RNA Komplex, also der geschlossenen Konformation, entspricht. Die zweite Komponente im Spektrum der ligandenfreien RT hat einen Interspinabstand von mehr als 19 Å, d.h., daß hier eine Konformation vorliegt, die ähnlich oder gleich der sein muß, die im RT-dsDNA Komplex vorliegt und damit offen ist. Der Anteil, der Spin-Spin-Wechselwirkung zeigt, variiert zwischen 67% bei 272 K bis 94% bei 313 K (vgl. Tabelle 3.6.2.3-1). Dies ist ein Beweis für ein temperaturabhängiges Gleichgewicht zwischen der offenen und der geschlossenen Form der Daumen-/Finger-Domäne der HIV-1 RT.

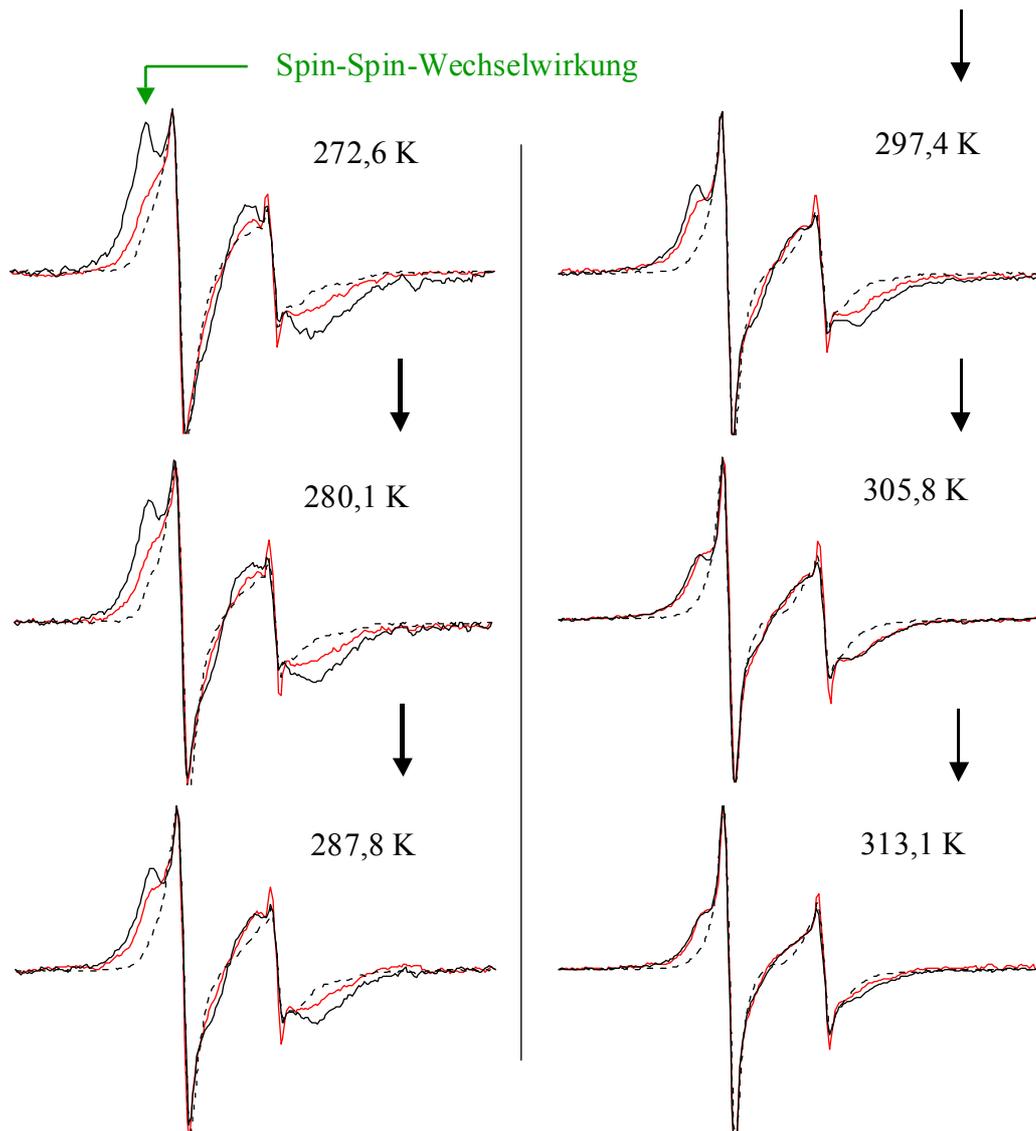


Abbildung 3.6.2.3-1: ESR Spektren der zweifach spinmarkierten RT Mutante RT^(W24C-R1, K287C-R1) im Temperaturbereich von 272 K bis 313 K. Die Spektren der ligandenfreien RT (—) sind im Vergleich mit denen des dsDNA- (---) und pseudoknot-RNA Komplexes (— · —) dargestellt.

Bestimmung der Enthalpie- und Entropiewerte für die Konformationsänderung

Mit Hilfe der für alle gemessenen Spektren durch mathematische Anpassung ermittelten Anteile der beiden Komplexe an den superponierten Spektren kann man die Enthalpie- und Entropiewerte für die betrachtete Konformationsänderung bestimmen. Die ermittelten Anteile sind in Tabelle 3.6.2.3-1 aufgeführt.

Der Quotient

$$K = x / y$$

der Anteile des -dsDNA Komplexes (x) und des RT-pseudoknot-RNA Komplexes (y) stellt die Gleichgewichtskonstante der Konformation der ligandenfreien RT dar. Die Temperaturab-

Tabelle 3.6.2.3-1: Durch mathematische Anpassung ermittelte Anteile der Spektren des RT-dsDNA- und -pseudoknot-RNA Komplexes in den superponierten Spektren.

T / (K)	x (Anteil RT-dsDNA)	y (Anteil RT-pseudoknot-RNA)	K= y / x
272,65	0,32894	0,67106	2,04007
280,15	0,2175	0,7825	3,5977
287,8	0,1496	0,8504	5,68449
297,4	0,09731	0,90269	9,27644
305,81	0,02575	0,97425	37,83945
313,15	0,06355	0,93645	14,73614

hängigkeit der Gleichgewichtskonstanten wird durch die van't Hoff'sche Reaktionsisochore beschrieben:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta_r H^0}{RT^2} \quad \text{Mit}$$

$$\frac{d(1/T)}{dT} = -\frac{1}{T^2} \quad \text{ergibt sich die Geradengleichung}$$

$$d \ln K = -\frac{\Delta_r H^0}{R} \cdot d(1/T) \quad .$$

Durch Auftragung von $\ln K$ gegen $1/T$ erhält man somit

$$-\frac{\Delta_r H^0}{R}$$

als die Steigung der Geraden.

Die lineare Regression der Daten (vgl. Abbildung 3.6.2.3-2) ergibt eine Geradensteigung von

$$-\frac{\Delta_r H^0}{R} = -4161,75 K^{-1} \quad .$$

Mit $R = 8,31441 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ergibt sich die Reaktionsenthalpie für die Konformationsänderung wie folgt:

$$\underline{\underline{\Delta H = 4161,75 K^{-1} \cdot 8,31441 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1} = 34,5 \text{ kJ mol}^{-1}}}$$

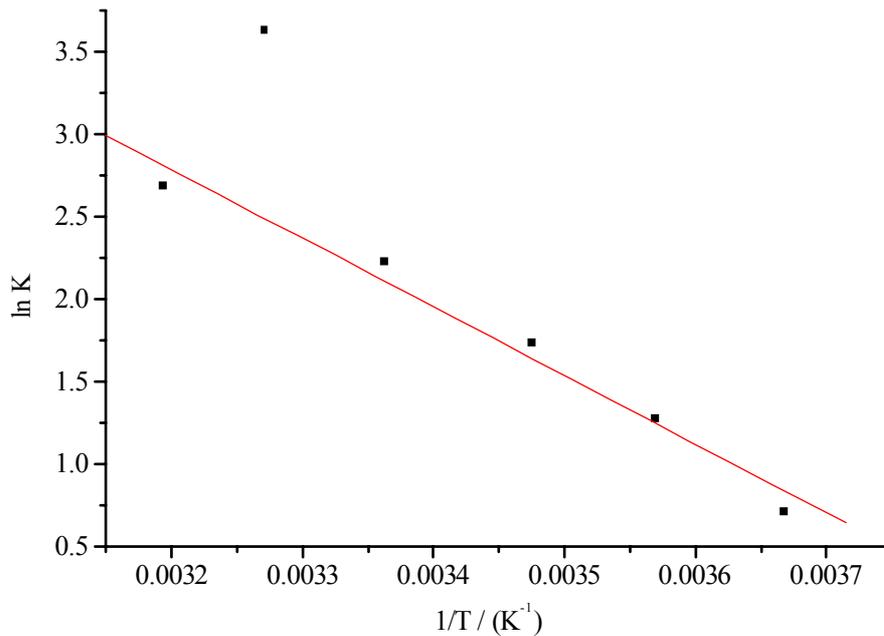


Abbildung 3.6.2.3-2: Auftragung der Gleichgewichtskonstanten für die Konformationsänderung der Daumen-/Finger-Domäne von HIV-1 RT gegen die inverse Temperatur. Die lineare Regression der Daten (—) liefert eine Steigung von $-4161,75 \text{ K}^{-1}$ und einen Y-Achsenabschnitt von 16,1. Der Datenpunkt bei $1/T = 0,00327$ wurde nicht in die lineare Regression einbezogen.

Die Entropieänderung für den Konformationsübergang

$$\Delta S = R \cdot d(\ln K)$$

beträgt mit dem aus der linearen Regression der Daten (vgl. Abbildung 3.6.2.3-2) bestimmten Achsenabschnitt von 16,1:

$$\underline{\underline{\Delta S = 8,31441 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \cdot 16,1 = 133,9 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}}}$$

3.6.2.4 Konformation von HIV-1 RT-NNRTI Komplexen in Lösung

Die Röntgen-Kristallstruktur-Analyse von HIV-1 RT im Komplex mit nicht-nukleosidischen RT Inhibitoren (NNRTIs) zeigt, daß das Enzym in diesen Komplexen in einer Konformation vorliegt, die noch weiter geöffnet ist, als die, die man für den RT-dsDNA Komplex der findet. Die NNRTIs binden in einer Hydrophoben Tasche in der Nähe der aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne. Da alle Röntgen-Kristallstrukturen von RT-NNRTI Komplexen eine offenen Konformation zeigen, liegt nahe, das die Inhibitoren diese Konformation stabilisieren. Während der C_{β} - C_{β} -Abstand der Positionen 24 und 287 in p66 des RT-dsDNA Komplexes $35,1 \text{ \AA}$ beträgt, sind die entsprechenden C_{β} -Atome im Komplex mit dem nicht-nukleosidischen RT Inhibitor 9-Cl TIBO, $37,6 \text{ \AA}$ voneinander entfernt^[30].

Um die Konformation von RT im Komplex mit den NNRTIs, Nevirapine^[81] und S-TIBO^[82], einem TIBO Derivat, in Lösung zu untersuchen, wurde ebenfalls die doppelt spinmarkierte

RT-Mutante RT^(W24C-R1, K287C-R1) verwendet. Abbildung 3.6.2.4-1 zeigt die ESR-Spektren der beiden Komplexe im Vergleich mit einer Superposition der einfach markierten Mutanten

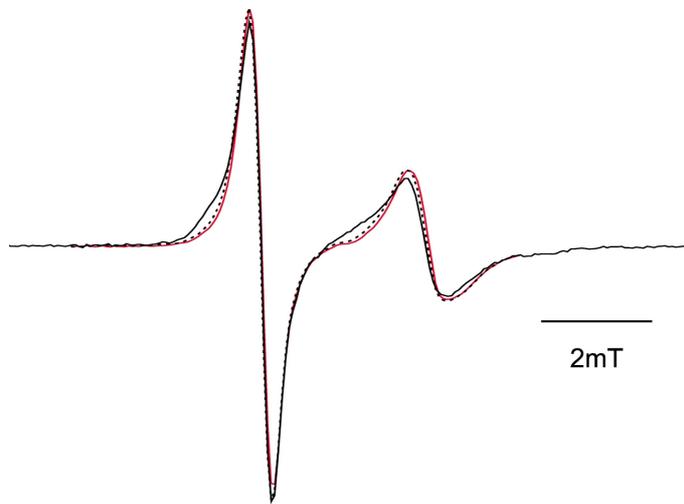


Abbildung 3.6.2.4-1: ESR-Spektren der zweifach spinmarkierten RT-Mutante im Komplex mit Nevirapine (—) und S-TIBO (---). Zusätzlich ist die Superposition der beiden einfach markierten RT-Mutanten dargestellt (·-·).

(vgl. 3.6.2.1). Die etwas geringere Linienbreite der Spektren der RT-NNRTI Komplexe zeigt deutlich, daß keine Wechselwirkung zwischen den Spinsonden stattfindet. Daher liegt in Lösung (25°C) eine offene Konformation der RT im Komplex mit den NNRTIs Nevirapine und S-TIBO vor, die durch die Bindung der Inhibitoren stabilisiert wird. Zusätzlich gibt die verringerte Linienbreite einen Hinweis auf eine verringerte Wechselwirkung der gebundenen Spinsonden mit der Umgebung in diesen Komplexen.

3.7 Analyse der Konformation von HIV-1 RT-Primer/Matrizen Komplexen mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie

Anhand von kinetischen Untersuchungen zur Substratbindung der HIV-1 RT wurde postuliert, daß sich bei der Bindung von RT an ein Nukleinsäure-Substrat (DNA/DNA, DNA/RNA oder RNA/RNA) drei Komplexe unterschiedlicher Konformation bilden können (vgl. 1.6). Um dieses Postulat zu überprüfen wurde in dieser Arbeit die Konformation von RT-Primer/Matrize Komplexen durch Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie, in Kombination mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) analysiert (vgl. 2.5.2.2). Durch FRET lassen sich unterschiedliche Konformationen eines Komplexes identifizieren. Hierzu werden beide Bindungspartner an bestimmten Positionen mit einem Donor- bzw. einem Akzeptor-Fluorophor markiert und die Abstände zwischen diesen Fluorophoren analysiert. Unterschiedliche Abstände zwischen den Fluorophoren deuten auf unterschiedliche

Komplexe hin. Die Technik der Einzelmolekül-Spektroskopie ermöglicht es darüber hinaus zwischen verschiedenartigen Konformationen in einem Gemisch zu unterscheiden. Der hier gewählte Ansatz zur Bestimmung der Konformation der Komplexe basiert auf der ortsspezifischen Markierung der RT sowie der Nukleinsäure mit Fluorophoren. Hierbei wird das Enzym mit einem Donor-Fluorophor (Alexa488) und die Nukleinsäure mit einem Akzeptor-Fluorophor (Cy5) markiert. Bildet sich nun ein Komplex aus markiertem Enzym und markierter Nukleinsäure, erhält man ein FRET-System das Informationen über die relative Orientierung von Enzym und Nukleinsäure liefert. Basierend auf den verfügbaren Kristallstrukturen der RT-dsDNA Komplexe können dann Rückschlüsse auf die Konformation der vorliegenden Komplexe getroffen werden.

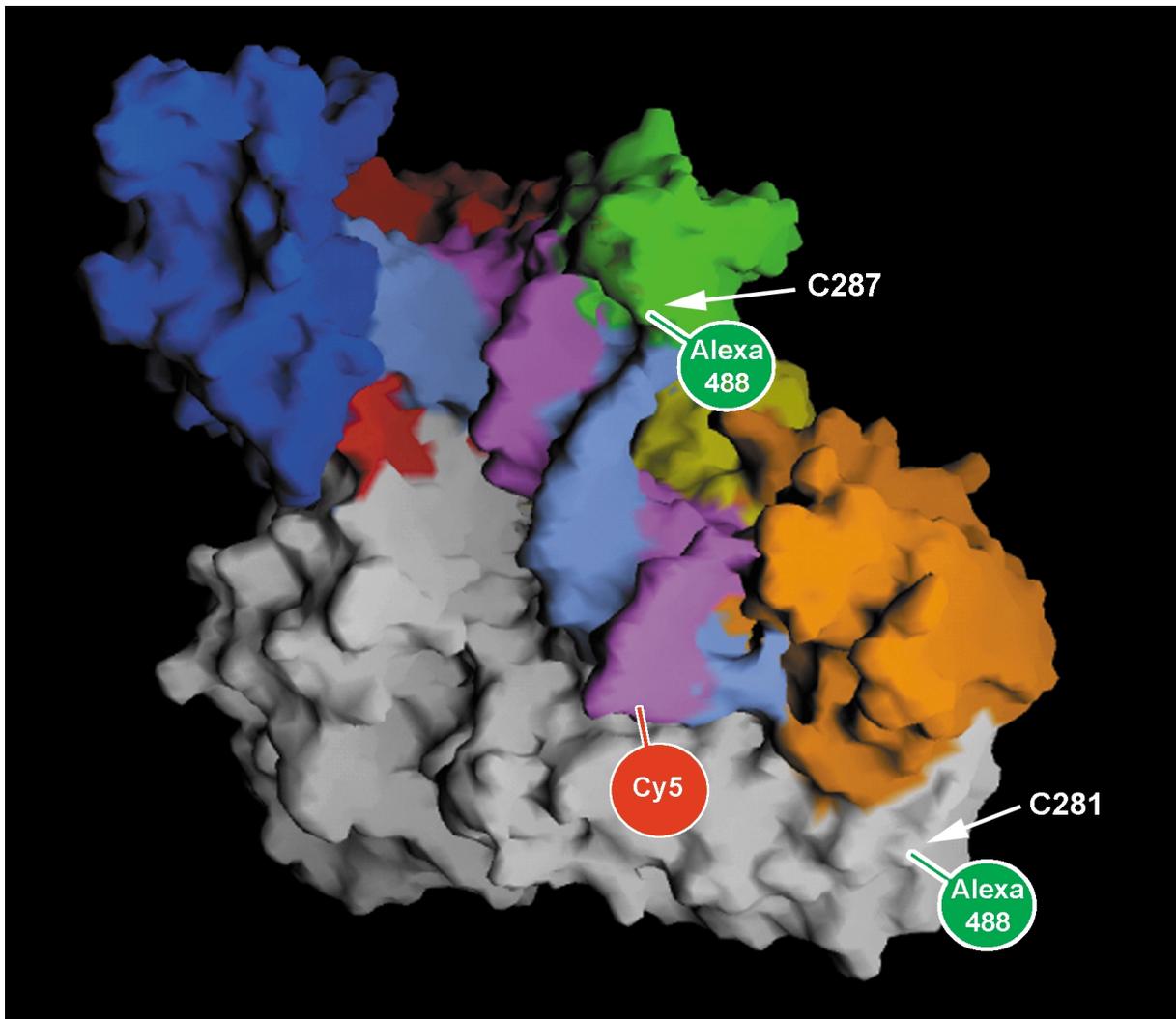


Abbildung 3.7-1: Anordnung der Fluorophore in den RT-Nukleinsäure Komplexen der Mutanten RT^(K281C) und RT^(K287C) mit den markierten Positionen Cys281 in p51 und Cys287 in p66.

Konkret wurden für die Experimente die RT-Mutanten p66^(C38S, C280S)/6H-p51^(C280S, K281C) und p66^(C38S, C280S, K287C)/6H-p51^(C280S) (im Folgenden als RT^(K281C) bzw. RT^(K287C) bezeichnet) konstruiert, die jeweils ein markierbares Cystein an einer definierten Position besitzen (Cys281 in p51 bzw. Cys287 in p66). Diese Mutanten wurden dann mit dem Donor-Fluorophor markiert (vgl. 2.2.3). Der Akzeptor Cy5 wurde an das 5'-Ende einer 19mer DNA gekoppelt. Diese DNA (PBSCy5) wurde als Primer an eine 35mer DNA- (DNA) oder RNA-Matrize (RNA) hybridisiert, deren Sequenz der HIV-1 PBS-Sequenz entspricht (vgl. 1.4). Daraus ergeben sich die Primer/Matrize Komplexe PBSCy5/DNA und PBSCy5/RNA. Abbildung 3.7-1 zeigt schematisch die Anordnung der Fluorophore in den RT-Nukleinsäure Komplexen. Die Abstände zwischen den C_β-Atomen der markierten Cysteine und dem 5'-Ende des Primers betragen in dieser Kristallstruktur ~37Å für die Mutante RT^(K281C) und ~39Å für die Mutante RT^(K287C).

3.7.1 Darstellung der Ergebnisse der Einzelmolekül-Experimente in 2D-Diagrammen

Zur Auswertung der Einzelmolekül-Experimente werden die gemessenen Intensitäten für den grünen Spektralbereich (um 535 nm, Alexa488-Fluoreszenz) und den roten Spektralbereich (um 730 nm, Cy5-Fluoreszenz) in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt (vgl. Abbildung 3.7.1-1). Die Diagramme werden wie folgt erstellt. In einem ersten Schritt wird die Summe der Rohsignale der vier Detektoren durch Anlegen eines Schwellenwertes gefiltert. Alle Photonenbursts die eine größere Anzahl von Photonen als der Schwellenwert aufweisen werden selektiert. Für die so selektierten Einzelmolekül-Ereignisse (Photonenbursts) werden dann, getrennt nach Spektralbereichen (grün und rot), Histogramme erstellt, in denen die Intensität der Fluoreszenz, in 1000Photonen/s (kHz), gegen die Anzahl der Einzelmolekül-Ereignisse mit dieser Intensität aufgetragen werden (vgl. Abbildung 3.7.1-1). Durch Kombination der Histogramme für den grünen und den roten Spektralbereich erhält man schließlich ein zweidimensionales Diagramm, das sogenannte „Inseln“ aufweist. Jedem Punkt einer Insel kann eine Intensität im grünen und roten Spektralbereich sowie eine Häufigkeit zugeordnet werden.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Einzelmolekül-Experimente wurden mindesten einmal wiederholt. Da die einzelnen Experimente jeweils nahezu identische Ergebnisse lieferten wurden sie summiert. Diese summierten Messungen sind im Ergebnisteil gezeigt. Die Einzelmessungen befinden sich im Anhang (vgl. 6.3).

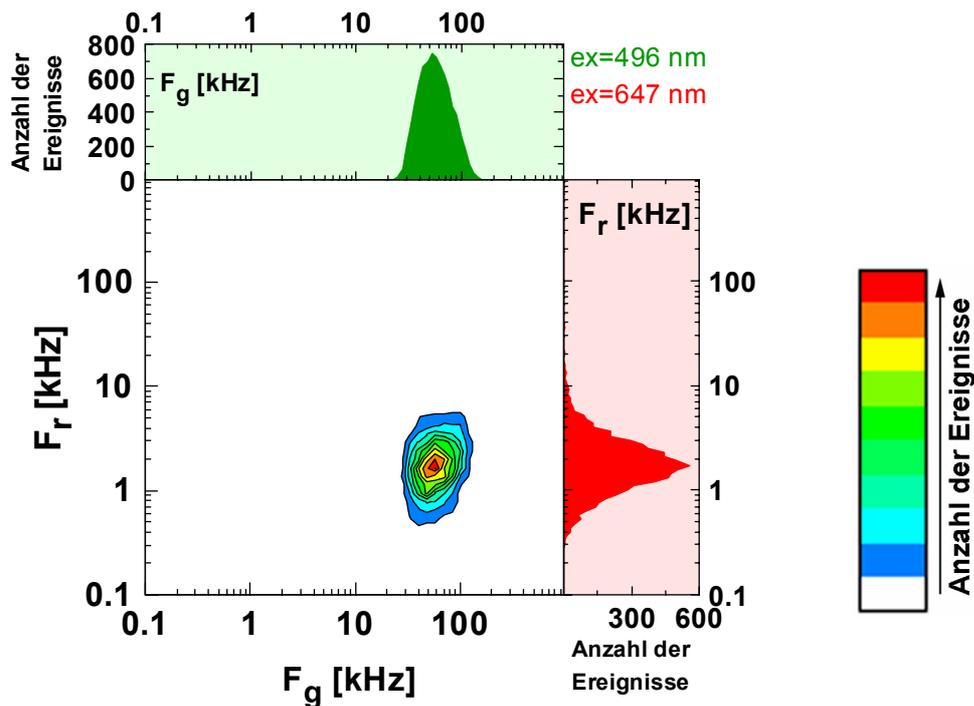


Abbildung 3.7.1-1: Links: Zweidimensionale Darstellung der von den gemessenen Intensitäten (vgl. 2.5.2.1.1). F_g : Intensitäten des grünen Spektralbereichs (Summe der Intensitäten der Detektoren 1 und 3); F_r : Intensitäten des roten Spektralbereichs (Summe der Intensitäten der Detektoren 2 und 4). Die Histogramme (oben und rechts) zeigen die Intensitätsverteilung der detektierten Ereignisse für die jeweiligen Spektralbereiche/Detektoren. „ex“ gibt die in dem Experiment verwendete(n) Anregungswellenlänge(n) an. Rechts: Farbcode für das zweidimensionale Diagramm. Weitere Erläuterungen sind im Text aufgeführt.

„Reinigung“ der Daten durch Ausschluß photozerstörter Fluorophore

Durch die hohe Energie des Anregungslichtes der Laser werden die Fluorophore teilweise photozerstört. Fluorophore, die in das Anregungsvolumen diffundieren und während ihres Aufenthalts in diesem Volumen photozerstört werden, führen zu Fehlinterpretation der Daten, da sie nach der Zerstörung nicht mehr fluoreszieren. Die Auswertung der Meßdaten zeigt dann eine verringerte Intensität im Fluoreszenzbereich des zerstörten Fluorophors. Um solche Moleküle aus dem Datensatz zu entfernen wurde wie folgt verfahren. Trägt ein betrachteter Komplex Donor und Akzeptor, so werden die Verweildauern T_g (Donor) und T_r (Akzeptor) im Detektionsvolumen für beide Fluorophore gleich lang sein. Wird einer dieser Fluorophore während des Aufenthalts in diesem Volumen zerstört, so weicht die Differenz der Verweildauern beider Moleküle ($T_g - T_r$) deutlich von Null ab. Mit diesem Selektionskriterium können Ereignisse, bei denen Photozerstörung aufgetreten ist, identifiziert und ausgesondert werden. Wie exemplarisch in Abbildung 3.7.1-2 dargestellt, wurden alle im

Folgenden gezeigten Daten mit dem Selektionskriterium $-0,55 \text{ ms} < T_g - T_r < 0,55 \text{ ms}$ „gereinigt“, d.h. Ereignisse außerhalb dieses Bereiches wurden nicht berücksichtigt.

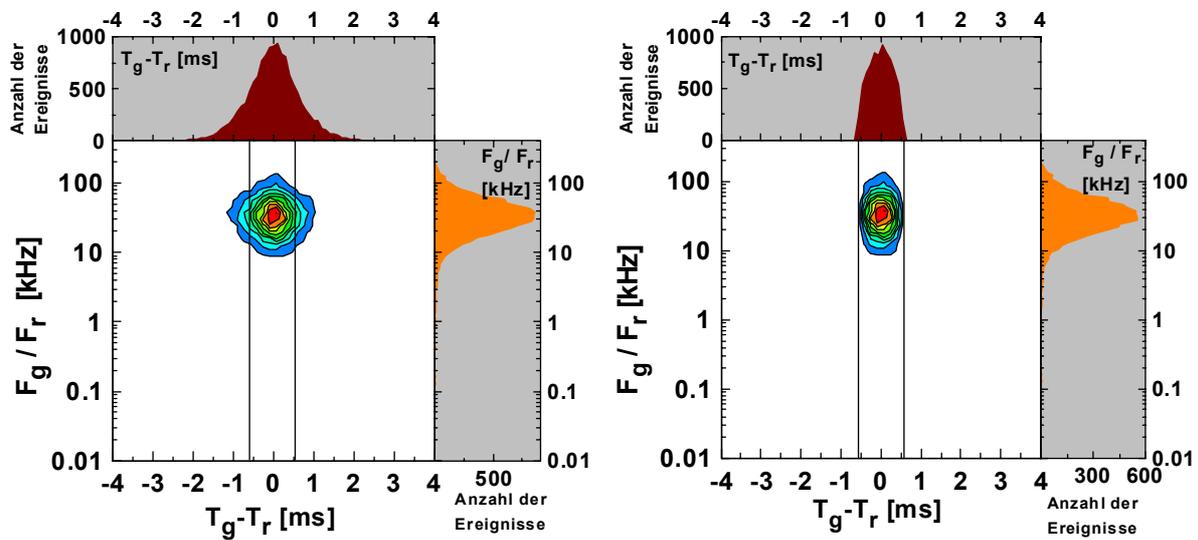


Abbildung 3.7.1-2: Ausschluß von Ereignissen, bei denen Photozerstörung aufgetreten ist. Links: Daten vor der Selektion; Rechts: Daten nach der Selektion mit $-0,55 \text{ ms} < T_g - T_r < 0,55 \text{ ms}$.

3.7.2 Meßergebnisse der Einzelmolekül-Experimente

3.7.2.1 Alexa488 markierte RT-Mutanten $RT^{(K281C)}$ und $RT^{(K287C)}$

Um die Fluoreszenzintensitäts-Verteilung der FRET-Messungen von RT-Nukleinsäure Komplexe interpretieren zu können, ist es notwendig, die Fluoreszenzintensität des Donors in Abwesenheit des Akzeptors zu kennen. Daher wurden die Alexa488 markierten RT-Mutanten $RT^{(K281C-Alexa488)}$ und $RT^{(K287C-Alexa488)}$ unter gleichen Bedingungen wie die Komplexe ohne Substrat gemessen (Abbildung 3.7.2.1-1). Die 2D-Diagramme zeigen für beide Mutanten eine einzige Spezies mit mittleren Fluoreszenzintensitäten von $F_g/F_r = 54,45 \text{ kHz}/1,65 \text{ kHz}$ für $RT^{(K281C-Alexa488)}$ und $F_g/F_r = 49,67 \text{ kHz}/1,81 \text{ kHz}$ für $RT^{(K287C-Alexa488)}$. Die Fluoreszenz-anregung (ex) erfolgte parallel bei 496 nm und 647 nm.

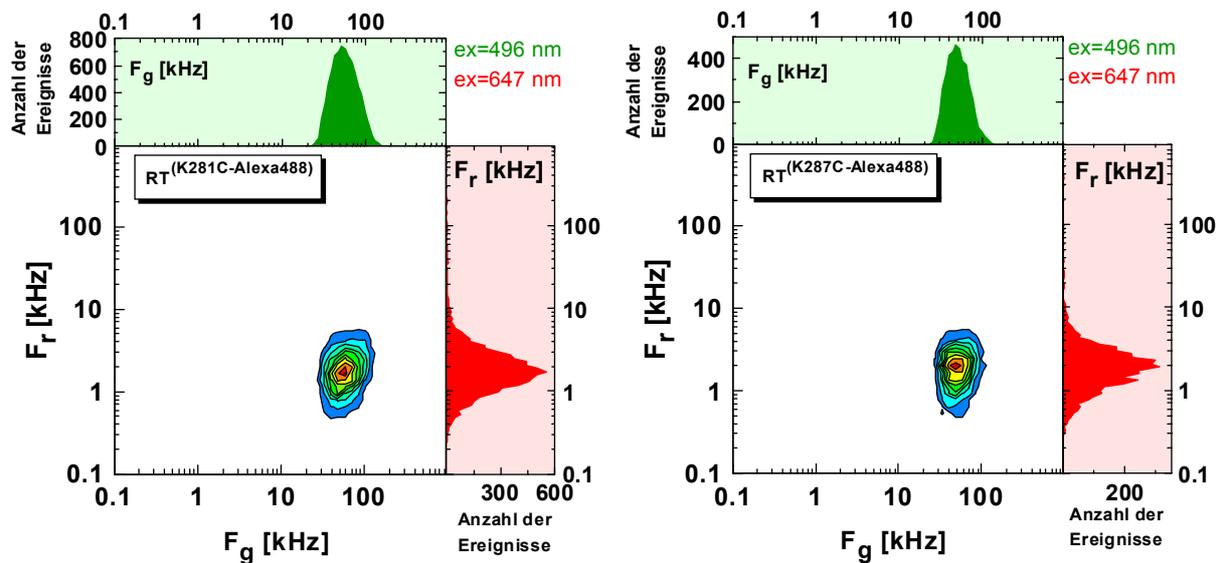


Abbildung 3.7.2.1-1: 2D-Diagramme aus den Messungen der Donor markierten RT-Mutanten $RT^{(K281C-Alexa488)}$ und $RT^{(K287C-Alexa488)}$, mit mittleren Fluoreszenzintensitäten von $F_g/F_r = 54,45 \text{ kHz}/1,65 \text{ kHz}$ bzw. $F_g/F_r = 49,67 \text{ kHz}/1,81 \text{ kHz}$. Die Anregung erfolgte bei 496 nm und 647 nm.

3.7.2.2 $RT^{(K281C-Alexa488)}$ im Komplex mit DNA/DNA und DNA/RNA Substraten

In den Kristallstrukturen der RT mit dsDNA beträgt der Abstand der Position 281 in p51 und dem 5'-Ende des Primerstranges der Nukleinsäure $\sim 37 \text{ \AA}$. In den Primer/Matrizen-Komplexen PBSCy5/DNA und PBSCy5/RNA ist das 5'-Ende des Primerstranges (PBSCy5) mit dem Akzeptor Cy5 markiert. Der Abstand zum Alexa488-markierten Cys281 (p51) der Mutante $RT^{(K281C-Alexa488)}$ sollte im Komplex mit PBSCy5/DNA oder PBSCy5/RNA daher $\sim 40 \text{ \AA}$ betragen, wenn die Konformation des Komplexes der aus der Kristallstruktur entspricht. Mit

einem R_0 -Wert von $\sim 51\text{\AA}$ sollte die Effizienz des Energietransfers vom Donor auf den Akzeptor, bei einem Donor-Akzeptor-Abstand von $\sim 40\text{\AA}$, zwischen 70% und 80% betragen (vgl. 2.5.2.2). Demzufolge sollte die Fluoreszenz des Donors stark erniedrigt und die des Akzeptors entsprechend erhöht sein.

$RT^{(K281C-Alexa488)}$ im Komplex mit PBSCy5/DNA

Betrachtet man das 2D-Diagramm der Einzelmolekül-Messung (ex = 496nm) des Komplexes aus $RT^{(K281C-Alexa488)}$ und PBSCy5/DNA, so erkennt man zwei Spezies, die sich in ihren Fluoreszenzintensitäten deutlich voneinander unterscheiden (Abbildung 3.7.2.2-1, links). Ein Teil der Moleküle zeigt mit $F_g = 7.90$ kHz eine sehr stark verringerte Donor-Fluoreszenz. Diese niedrige Intensität korrespondiert mit einer stark erhöhten Intensität von $F_r = 43,71$ kHz im roten Spektralbereich. Die Erhöhung der Intensität im roten und die gleichzeitige Erniedrigung im grünen Spektralbereich zeigt, daß bei diesen Komplexen ein großer Energietransfer stattgefunden hat. Anhand der Verringerung der Intensität der Donor-Fluoreszenz auf $\sim 15\%$ des Wertes in Abwesenheit des Akzeptors kann man abschätzen, daß die Transfereffizienz mehr als 75% beträgt. Das bedeutet wiederum, daß der Abstand der Fluorophore maximal 45\AA beträgt (vgl. 2.5.2.2). Damit entspricht die Konformation dieser

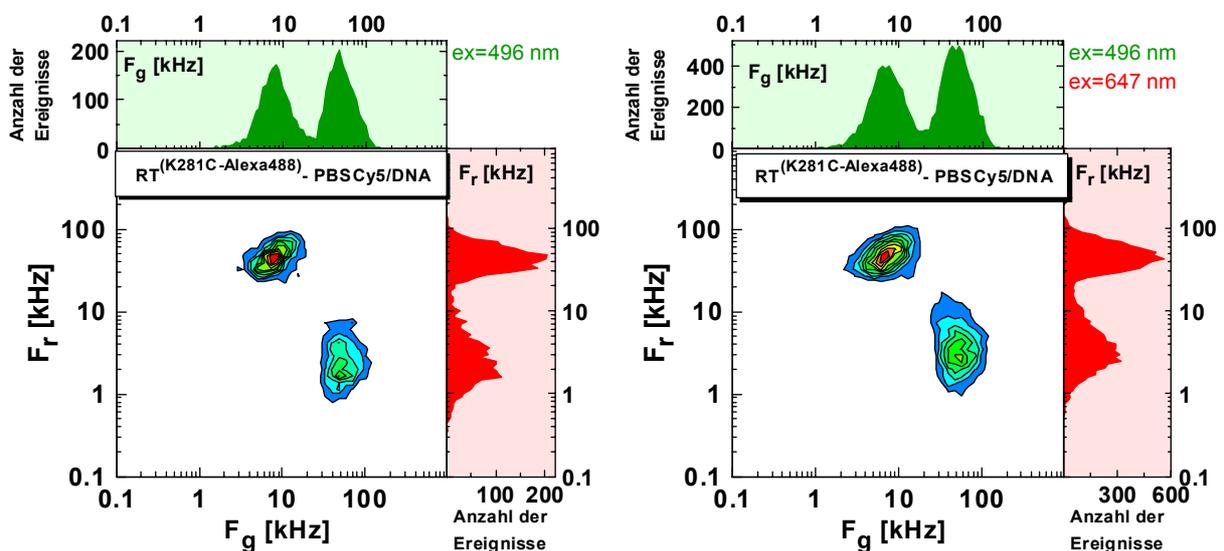


Abbildung 3.7.2.2-1: Intensitätsauswertung der Einzelmolekül-Messungen in 2D-Diagrammen für den Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA. links: Anregung bei 496 nm liefert zwei Spezies mit mittleren Intensitäten von $F_g/F_r = 7,90$ kHz/43,71 kHz und $F_g/F_r = 52,51$ kHz/2,06 kHz; rechts: Die Koinzidenzanalyse (Anregung bei 496 nm und 647 nm) liefert mittlere Intensitäten von $F_g/F_r = 6,99$ kHz/46,46 kHz und $F_g/F_r = 49,26$ kHz/ 2,89 kHz.

Komplexe mit großer Wahrscheinlichkeit der, die für die RT-dsDNA Komplexe in den Kristallstrukturen gefunden wurde. Die zweite Spezies zeigt mit $F_g/F_r = 52,51$ kHz/2,06 kHz

ähnliche Intensitäten wie die ligandenfreie RT-Mutante $RT^{(K281C-Alexa488)}$ ($F_g/F_r = 54,45$ kHz/1,65 kHz, vgl. 3.7.2.1). Zwar deutet die etwas geringere Intensität im grünen und die leicht erhöhte Intensität im roten Spektralbereich auf einen geringen Energietransfer und damit auf das Vorhandensein von FRET-Komplexen hin, jedoch sind die Unterschiede sehr gering. Um festzustellen, ob es sich bei dieser Spezies um ligandenfreie RT oder den Komplex mit der Nukleinsäure handelt, kann man eine Koinzidenzanalyse durchführen. Hierbei wird nicht nur der Donor direkt angeregt, sondern auch der Akzeptor. Dadurch erreicht man, daß der in einem Komplex vorhandene Akzeptor ohne Energietransfer vom Donor eine vom Hintergrund unterscheidbare Intensität zeigt. Die Intensität des roten Lasers wurde für diese Experimente so gewählt, daß die Verschiebung der Fluoreszenzintensität deutlich ist, die Trennung von der anderen Spezies aber erhalten bleibt. Wählt man eine zu niedrige Intensität, verändert sich die Akzeptor-Fluoreszenz nicht signifikant. Ist die gewählte Intensität sehr hoch, können die beiden „Inseln“ im 2D-Diagramm evtl. nicht mehr getrennt werden, da die „Insel“ mit hoher grüner und geringer roter Intensität, zu hoher grüner und hoher roter Intensität „verschoben“ wird. In Abbildung 3.7.2.2-1 ist die Koinzidenzanalyse des Komplexes aus $RT^{(K281C-Alexa488)}$ und PBSCy5/DNA dargestellt. Man erkennt, daß durch gleichzeitige Anregung mit rotem Licht, die Intensitäten im grünen Spektralbereich, mit 6,99 kHz und 52,51 kHz nicht oder nur unwesentlich verändert sind. Demgegenüber ist die Intensität der Spezies, die eine hohe Intensität im grünen Spektralbereich zeigt, im roten Spektralbereich signifikant auf 2,89 kHz gestiegen. Zum Vergleich zeigen die ligandenfreie RT und der Komplex Intensitäten von 1,65 kHz bzw. 2,06 kHz. Dieses Ergebnis zeigt, daß neben dem Donor auch der Akzeptor in dieser Spezies enthalten ist. Die Koinzidenzanalyse zeigt also, daß auch die zweite Spezies einem Komplex aus markiertem Enzym und markierter Nukleinsäure entspricht. Die Intensitätsverteilung in diesen Komplexen deutet auf einen eventuell vorhandenen geringen Energietransfer ($< 5\%$) hin (s.o.), obgleich die Abweichungen von den Intensitäten der ligandenfreien RT zu gering sind um Aussagen machen zu können. Damit sind in dieser Konformation des Komplexes die Fluorophore mindestens 80\AA voneinander entfernt, wodurch sich die Konformation deutlich von der für die andere Spezies unterscheidet. Eine vorstellbare Anordnung für Enzym und Substrat in diesem Komplex wäre, daß der Primer/Matrize Komplex um 180° gedreht an das Enzym bindet, so daß sich das 5'-Ende des Primerstranges in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne befindet. Entsprechend den Kristallstrukturen wären die Fluorophore in dieser Anordnung $\sim 80\text{\AA}$ voneinander entfernt.

$RT^{(K281C-Alexa488)}$ im Komplex mit PBSCy5/RNA

Die Einzelmolekül-Experimente mit dem Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA haben gezeigt, daß in Lösung mindestens zwei Komplexe mit unterschiedlichen Konformationen existieren. Die oben beschriebenen Untersuchungen zur Substratbindung von HIV-1 RT geben Hinweise darauf, daß das Verhältnis der Anteile dieser Konformationen von der Natur des Substrates (DNA/DNA oder DNA/RNA) abhängig ist (vgl. 1.6)^[33]. Um dies zu validieren wurden ebenfalls Einzelmolekül-Experimente mit dem DNA/RNA-Substrat PBSCy5/RNA durchgeführt. Die Sequenz dieses Substrates ist identisch mit der des DNA/DNA-Substrates PBSCy5/DNA. Eine detaillierte Analyse dieser Komplexverteilung erfolgt in 3.7.2.4.

Das 2D-Diagramm aus der Einzelmolekül-Messung des Komplexes $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA, läßt wie die Messungen mit PBSCy5/DNA zwei Spezies erkennen, die sich in ihren Fluoreszenzintensitäten deutlich voneinander unterscheiden (Abbildung 3.7.2.2-2, links). Ein Teil der Moleküle zeigt mit $F_g = 6,57$ kHz eine sehr stark verringerte Donor-Fluoreszenz. Diese niedrige Intensität korrespondiert mit einer stark erhöhten Intensität von $F_r = 46,46$ kHz im roten Spektralbereich. Die Erhöhung der Intensität im roten und die gleichzeitige Erniedrigung im grünen Spektralbereich zeigt, daß bei diesen Komplexen ein hoher Energietransfer stattgefunden hat. Aufgrund der Verringerung der Intensität der Donor-Fluoreszenz auf $\sim 15\%$ des Wertes in Abwesenheit des Akzeptors, kann man abschätzen, daß

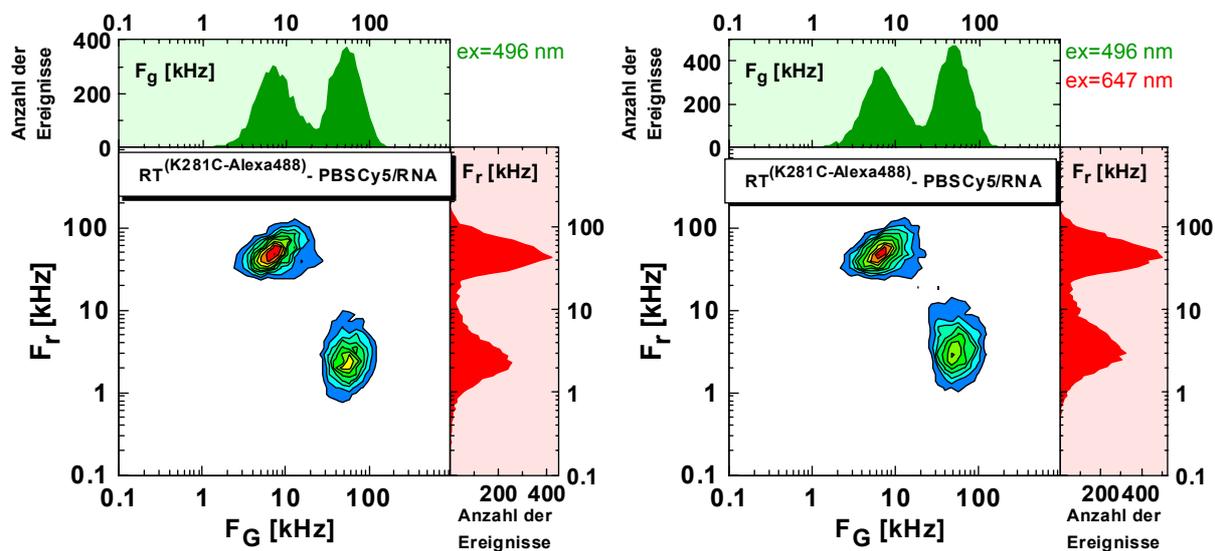


Abbildung 3.7.2.2-2: Intensitätsauswertung der Einzelmolekül-Messungen in 2D-Diagrammen für den Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA. links: Anregung bei 496 nm liefert zwei Spezies mit mittleren Intensitäten von $F_g/F_r = 6,57$ kHz/46,46 kHz und $F_g/F_r = 55,81$ kHz/2,19 kHz; rechts: Die Koinzidenzanalyse (Anregung bei 496 nm und 647 nm) liefert mittleren Intensitäten von $F_g/F_r = 6,57$ kHz/46,46 kHz und $F_g/F_r = 52,51$ kHz/ 2,97 kHz.

die Transfereffizienz mehr als 75% beträgt. Das bedeutet wiederum, daß der Abstand der Fluorophore maximal 45Å beträgt (vgl. 2.5.2.2). Damit entspricht die Konformation dieser Komplexe mit großer Wahrscheinlichkeit der, die für die RT-dsDNA Komplexe in den Kristallstrukturen gefunden wurde.

Die zweite Spezies zeigt mit $F_g/F_r = 55,81 \text{ kHz}/2,19 \text{ kHz}$ ähnliche Intensitäten wie die ligandenfreie RT-Mutante $RT^{(K281C-Alexa488)}$ (vgl. 3.7.2.1). Die Koinzidenzanalyse (siehe $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA) liefert eine mittlere Intensität $F_r = 2,97 \text{ kHz}$ für diese Spezies im grünen Spektralbereich. Die signifikante Intensitätserhöhung von 2,19 kHz auf 2,97 kHz zeigt, daß es sich auch bei dieser Spezies um Komplexe aus RT und Nukleinsäure handelt.

Auch hier zeigt die zweite Spezies, bei grüner Anregung (496 nm), im Vergleich zum ligandenfreien Enzym eine etwas erhöhte Intensität im roten Spektralbereich, was auf einen eventuell vorhandenen geringen Energietransfer (< 5%) hindeutet. Jedoch ist die Abweichungen von den Intensitäten der ligandenfreien RT nicht signifikant. Daher kann geschlossen werden, daß in dieser Konformation des Komplex die Fluorophore mindestens 80Å voneinander entfernt sind, wodurch sich diese Konformation deutlich von der für die andere Spezies unterscheidet. Wie bereits für den RT-Komplex mit PBSCy5/DNA könnten sich auch in diesem Komplex Enzym und Substrat so anordnen, daß die Primer/Matrize um 180° gedreht an das Enzym bindet, so daß sich das 5'-Ende des Primerstranges in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne befindet.

Vergleicht man die Ergebnisse der Messungen mit der RT-Mutante $RT^{(K281C-Alexa488)}$ im Komplex mit PBSCy5/RNA und PBSCy5/DNA, so lassen sich weder in den absoluten Intensitäten, noch in der Verteilung der unterschiedlichen Konformationen signifikante Unterschiede erkennen.

3.7.2.3 $RT^{(K287C-Alexa488)}$ im Komplex mit DNA/DNA und DNA/RNA Substraten

Durch die Experimente mit der RT-Mutante $RT^{(K281C-Alexa488)}$ konnten zwei RT-Nukleinsäure Komplexe mit unterschiedlichen Konformationen identifiziert werden. Eine dieser Konformationen entspricht vermutlich der, die in den Kristallstrukturen der RT-Nukleinsäure Komplexe vorliegt. Hier befindet sich das 3'-Ende des Primerstranges, der an die RT gebundenen Primer/Matrize, in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne. Eine mögliche Konformation des zweiten Komplexes wäre die, in der sich das 5'-Ende des Primerstranges in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne befindet (vgl. 3.7.2.2.). Um die postulierten Konformationen in einem unabhängigen Experiment zu überprüfen wurde die RT-Mutante $RT^{(K287C-Alexa488)}$ verwendet. Mit dem Donor an Position

287 in p66 würde man für die Konformation, die in den Kristallstrukturen vorliegt, einen hohen Energietransfer zum Akzeptor am 5'-Ende des Primerstranges erwarten, da der Abstand der Positionen 287 in p66 und 281 in p51 zum 5'-Ende des Primerstranges ähnlich sind (vgl. 3.7). Sollte sich das 5'-Ende des Primerstranges in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne binden, wie für die zweite Konformation vermutet, so würde man ebenfalls einen hohen Energietransfer erwarten, da dann der Donor-Akzeptor-Abstand $\sim 30 \text{ \AA}$ betragen würde.

RT^(K287C-Alexa488) im Komplex mit PBSCy5/DNA

Das 2D-Diagramm der Einzelmolekül-Messung ($\text{ex} = 496\text{nm}$) des Komplexes aus RT^(K287C-Alexa488) und PBSCy5/DNA, zeigt zwei Spezies, die sich in ihren Fluoreszenzintensitäten, speziell im roten Spektralbereich deutlich voneinander unterscheiden (Abbildung 3.7.2.3-1, links). Ein Teil der Moleküle zeigt mit $F_g = 19,75 \text{ kHz}$ eine stark verringerte Donor-Fluoreszenz. Diese niedrige Intensität korreliert mit einer erhöhten Intensität von $F_r = 25,21 \text{ kHz}$ im roten Spektralbereich. Die Erhöhung der Intensität im roten und die gleichzeitige Erniedrigung im grünen Spektralbereich zeigt, daß bei diesen Komplexen Energietransfer stattgefunden hat. Aufgrund der Verringerung der Intensität der Donor-Fluoreszenz auf $\sim 40\%$ des Wertes in Abwesenheit des Akzeptors, kann man abschätzen, daß die Transfereffizienz mehr als 50% beträgt. Das bedeutet wiederum, daß der Abstand der Fluorophore maximal 50 \AA beträgt (vgl. 2.5.2.2). Damit entspricht die Konformation dieser Komplexe mit großer Wahrscheinlichkeit der, die für die RT-dsDNA Komplexe in den Kristallstrukturen gefunden wurde.

Die zweite Spezies zeigt mit $F_g/F_r = 52,51 \text{ kHz}/2,06 \text{ kHz}$ ähnliche Intensitäten wie die ligandenfreie RT-Mutante RT^(K287C-Alexa488) ($F_g/F_r = 49,67 \text{ kHz}/1,81 \text{ kHz}$, vgl. 3.7.2.1). Die Koinzidenzanalyse (siehe RT^(K281C-Alexa488)-PBSCy5/DNA) liefert eine mittlere Intensität $F_r = 3,80 \text{ kHz}$ für diese Spezies im grünen Spektralbereich. Die signifikante Intensitätserhöhung von $1,81 \text{ kHz}$ auf $3,80 \text{ kHz}$ zeigt, daß es sich auch bei dieser Spezies um Komplexe aus RT und Nukleinsäure handelt.

Für die zweite Spezies kann auch hier gezeigt werden, daß diese bei grüner Anregung, im Vergleich zum ligandenfreien Enzym eine leicht erhöhte Intensität im roten Spektralbereich, was auf einen eventuell vorhandenen geringen Energietransfer ($< 5\%$) hindeutet. Die Abweichungen von den Intensitäten der ligandenfreien RT ist jedoch nicht aussagekräftig. Daher sind in dieser Konformation des Komplex die Fluorophore mindestens 80 \AA voneinander entfernt, wodurch sich die Konformation deutlich von der für die andere Spezies

unterscheidet. Durch dieses Experiment kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß es sich bei dieser zweiten Spezies um Komplexe handelt, in denen die Nukleinsäure, im Vergleich zum anderen Komplex um 180° gedreht, gebunden hat. Dadurch würde der an das 5'-Ende gebundene Akzeptor in die Nähe des aktiven Zentrum der Polymerase-Domäne rücken. Komplexe in dieser Konformation sollten nämlich einen hohen Energietransfer zeigen.

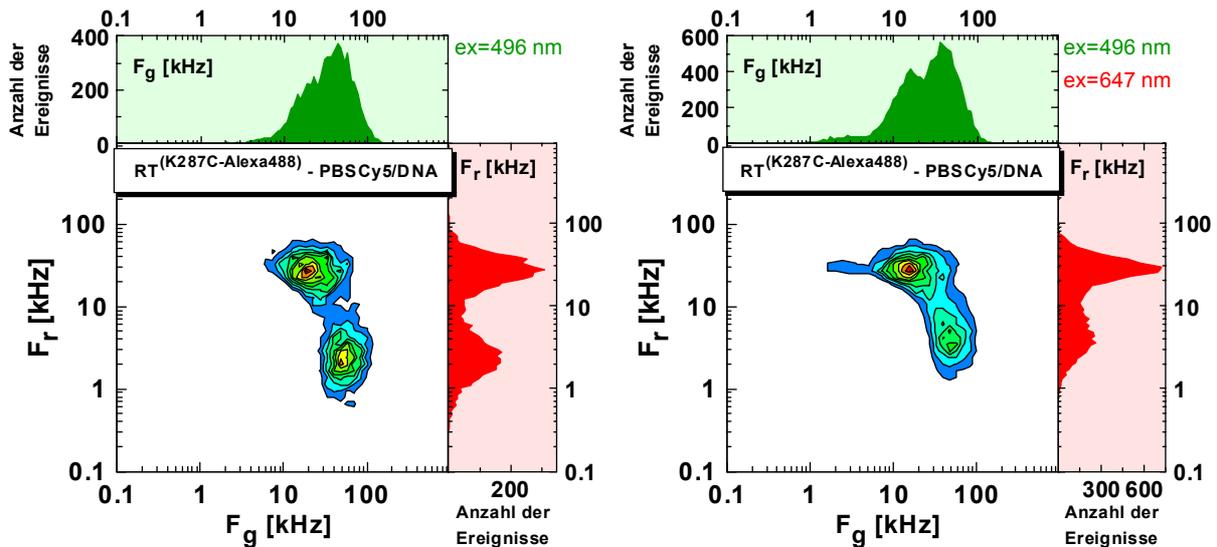


Abbildung 3.7.2.3-1: Intensitätsauswertung der Einzelmolekül-Messungen in 2D-Diagrammen für den Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA. links: Anregung bei 496 nm liefert zwei Spezies mit mittleren Intensitäten von $F_g/F_r = 19,75 \text{ kHz}/25,21 \text{ kHz}$ und $F_g/F_r = 52,51 \text{ kHz}/2,06 \text{ kHz}$; rechts: Die Koinzidenzanalyse (Anregung bei 496 nm und 647 nm) liefert mittleren Intensitäten von $F_g/F_r = 15,47 \text{ kHz}/26,81 \text{ kHz}$ und $F_g/F_r = 46,46 \text{ kHz}/ 3,80 \text{ kHz}$.

$RT^{(K287C-Alexa488)}$ im Komplex mit PBSCy5/RNA

Das 2D-Diagramm der Einzelmolekül-Messung (ex = 496nm) des Komplexes aus $RT^{(K287C-Alexa488)}$ und PBSCy5/RNA, zeigt zwei Spezies, die sich in ihren Fluoreszenzintensitäten, speziell im roten Spektralbereich deutlich voneinander unterscheiden (Abbildung 3.7.2.3-1, links). Ein Teil der Moleküle zeigt mit $F_g = 12,11 \text{ kHz}$ eine verringerte Donor-Fluoreszenz. Diese niedrige Intensität korreliert mit einer erhöhten Intensität von $F_r = 36,39 \text{ kHz}$ im roten Spektralbereich. Die Erhöhung der Intensität im roten und die gleichzeitige Erniedrigung im grünen Spektralbereich zeigt, daß bei diesen Komplexen Energietransfer stattgefunden hat. Aufgrund der Verringerung der Intensität der Donor-Fluoreszenz auf $\sim 25\%$ des Wertes in Abwesenheit des Akzeptors, kann man abschätzen, daß die Transfereffizienz mehr als 70% beträgt. Das bedeutet wiederum, daß der Abstand der Fluorophore maximal 45\AA beträgt (vgl.

2.5.2.2). Damit entspricht die Konformation dieser Komplexe mit großer Wahrscheinlichkeit der, die für die RT-dsDNA Komplexe in den Kristallstrukturen gefunden wurde.

Die zweite Spezies zeigt mit $F_g/F_r = 52,51 \text{ kHz}/1,82 \text{ kHz}$ ähnliche Intensitäten wie die ligandenfreie RT-Mutante $RT^{(K287C-Alexa488)}$ ($F_g/F_r = 49,67 \text{ kHz}/1,81 \text{ kHz}$, vgl. 3.7.2.1). Die Koinzidenzanalyse (siehe $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA) liefert eine mittlere Intensität $F_r = 3,57 \text{ kHz}$ für diese Spezies im grünen Spektralbereich. Die signifikante Intensitätserhöhung von $1,81 \text{ kHz}$ auf $3,80 \text{ kHz}$ zeigt, daß es sich auch bei dieser Spezies um Komplexe aus RT und Nukleinsäure handelt.

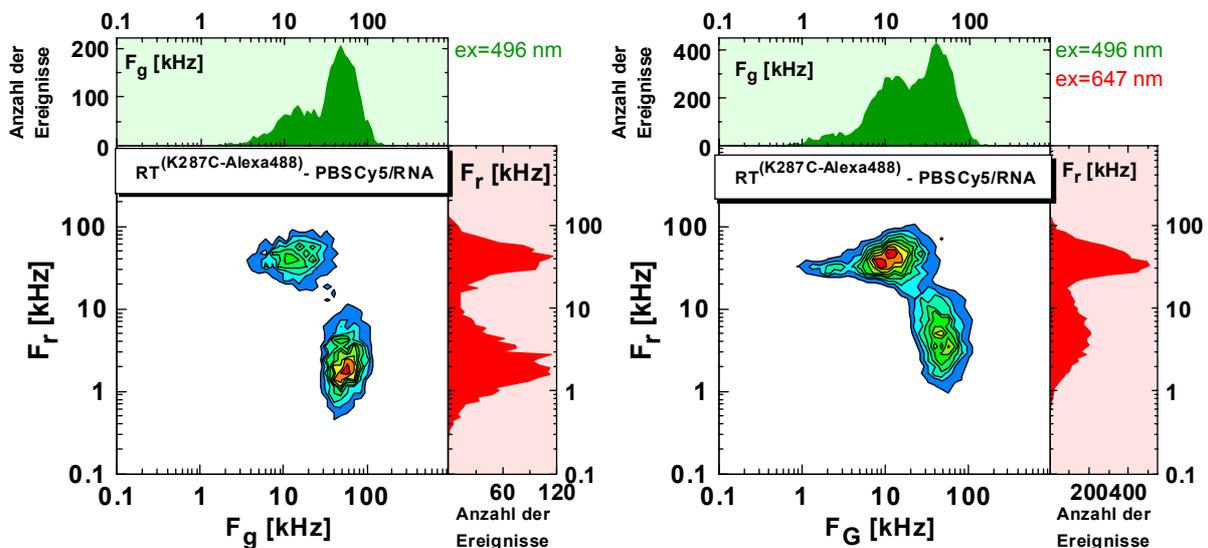


Abbildung 3.7.2.3-2: Intensitätsauswertung der Einzelmolekül-Messungen in 2D-Diagrammen für den Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA. links: Anregung bei 496 nm liefert zwei Spezies mit mittleren Intensitäten von $F_g/F_r = 12,11 \text{ kHz}/36,39 \text{ kHz}$ und $F_g/F_r = 52,51 \text{ kHz}/1,82 \text{ kHz}$; rechts: Die Koinzidenzanalyse (Anregung bei 496 nm und 647 nm) liefert mittleren Intensitäten von $F_g/F_r = 10,08 \text{ kHz}/36,39 \text{ kHz}$ und $F_g/F_r = 49,39 \text{ kHz}/ 3,57 \text{ kHz}$.

Auch hier zeigt die zweite Spezies, bei grüner Anregung, verglichen mit dem ligandenfreien Enzym, eine leicht erhöhte Intensität im roten Spektralbereich, woraus man auf einen eventuell vorhandenen geringen Energietransfer ($< 5\%$) schließen könnte. Die Abweichungen von den Intensitäten der ligandenfreien RT ist jedoch nicht signifikant. Daher sind in dieser Konformation des Komplex die Fluorophore mindestens 80\AA voneinander entfernt, wodurch sich die Konformation deutlich von der für die andere Spezies unterscheidet. Durch dieses Experiment kann jetzt auch für das DNA/RNA-Substrat ausgeschlossen werden, daß es sich bei dieser zweiten Spezies um Komplexe handelt, in denen sich die Nukleinsäure um 180° gedreht hat, wodurch der Akzeptor am 5'-Ende des Primerstranges in die Nähe des aktiven Zentrum der Polymerase-Domäne rücken würde.

Vergleicht man Ergebnisse der Messungen mit der RT-Mutante RT^(K287C-Alexa488) im Komplex mit PBSCy5/DNA und PBSCy5/RNA, so lassen sich signifikante Unterschiede erkennen. Die Unterschiede sind in den mittleren Intensitäten der Spezies erkennen, die in der Konformation vorliegt, die der der RT-dsDNA Komplexe entspricht. Für den Komplex der RT^(K287C-Alexa488) mit PBSCy5/DNA weist diese Spezies mittlere Intensitäten von $F_g/F_r = 19,75 \text{ kHz}/25,21 \text{ kHz}$ und $F_g/F_r = 15,47 \text{ kHz}/26,81 \text{ kHz}$ bei direkter Anregung des Donors (496 nm) bzw. bei direkter Anregung des Donors und des Akzeptors (496 nm + 647 nm) auf. Für den Komplex der RT^(K287C-Alexa488) mit PBSCy5/RNA weist diese Spezies mittlere Intensitäten von $F_g/F_r = 12,11 \text{ kHz}/36,39 \text{ kHz}$ und $F_g/F_r = 10,08 \text{ kHz}/36,39 \text{ kHz}$ bei direkter Anregung des Donors (496 nm) bzw. bei direkter Anregung des Donors und des Akzeptors (496 nm + 647 nm) auf. Sowohl im RT-DNA/DNA als auch im RT-DNA/RNA Komplex zeigen diese Spezies also Energietransfer. Allerdings ist der Energietransfer im Komplex mit DNA/RNA größer als im Komplex mit DNA/DNA, da bei DNA/RNA die Intensitäten im grünen Spektralbereich ~6 kHz niedriger und im roten Spektralbereich ~11 kHz höher sind, als in vergleichbaren Messungen mit DNA/DNA. Dieses Ergebnis deutet auf unterschiedliche Konformationen der Nukleinsäuren hin (vgl. 4.3).

3.7.2.4 Bestimmung der Anteile der unterschiedlichen Spezies in den RT-Nukleinsäure Komplexen

Die Einzelmolekül-Experimente mit fluoreszenzmarkierter RT und Nukleinsäure haben gezeigt, daß in Lösung mindestens zwei Spezies/Komplexe mit unterschiedlichen Konformationen existieren. Untersuchungen zur Substratbindung von HIV-1 RT geben Hinweise darauf, daß das Verhältnis der Anteile dieser Komplexe von der Natur des Substrates (DNA/DNA oder DNA/RNA) abhängig ist (vgl. 1.6). Aus den 2D-Diagrammen der Intensitätsverteilung (Auftragung F_r gegen F_g) kann, durch Selektion eines 2D-Intensitätsbereiches, die Anzahl der Ereignisse in diesem Bereich bestimmt werden. So können verschiedenen Spezies anhand der Einzelmolekül-Ereignisse quantifiziert werden. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3.7.2.4-1 aufgeführt.

In allen Experimenten kann zwischen zwei Spezies/Komplexen Unterschieden werden. Eine Spezies zeigt Energietransfer, mit geringer Intensität im grünen und hoher Intensität im roten Spektralbereich. Die zweite Spezies zeigt keinen oder nur geringen Energietransfer, mit hoher Intensität im grünen und geringer Intensität im roten Spektralbereich. Das Verhältnis (der Ereignisse) der beiden Spezies beträgt in allen Experimenten, mit einer Ausnahme, ca. 50:50. Nur für den Komplex RT^(K287C-Alexa488)-PBSCy5/RNA tritt bei einer Anregungswellenlänge von

496 nm, mit 40:60 eine abweichende Verteilung der beiden Spezies auf. Bei gleichzeitiger Anregung bei 496 nm und 647 nm beträgt das Verhältnis wiederum 50:50. Die zusätzliche Anregung bei 647 nm sollte allerdings keine Auswirkung auf das Verhältnis der beiden Spezies haben, wie alle anderen Messungen bestätigen. Im nächsten Abschnitt wird daher eine eingehendere, kinetische Analyse der Experimente beschrieben.

Tabelle 3.7.2.4-1: Anzahl der Ereignisse für verschiedenen Spezies aus den 2D-Diagrammen der Einzelmolekül-Experimente mit den Enzymen $RT^{(K281C-Alexa488)}$, $RT^{(K287C-Alexa488)}$ und den Substraten PBSCy5/DNA und PBSCy5/RNA und die daraus bestimmten prozentualen Verhältnisse zwischen den Spezies. F_g, F_r: Intensität im grünen bzw. roten Spektralbereich.

Enzym	$RT^{(K281C-Alexa488)}$				$RT^{(K287C-Alexa488)}$			
	PBSCy5/DNA		PBSCy5/RNA		PBSCy5/DNA		PBSCy5/RNA	
im Komplex mit	PBSCy5/DNA		PBSCy5/RNA		PBSCy5/DNA		PBSCy5/RNA	
Anregungswellenlänge im Experiment / [nm]	496	496 + 647	496	496 + 647	496	496 + 647	496	496 + 647
Ereignisse im Bereich der 1. Spezies (F _g gering, F _r hoch)	1793 (51%)	5051 (49%)	4047 (52%)	4882 (50%)	2822 (53%)	5477 (56%)	1155 (39%)	4212 (51%)
Ereignisse im Bereich der 2. Spezies (F _r gering, F _g hoch)	1722 (49%)	5279 (51%)	3665 (48%)	4913 (50%)	2480 (47%)	4260 (44%)	1816 (61%)	4028 (49%)

Kinetische Analyse der Einzelmolekül-Experimente

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der Verteilung der zwei unterscheidbaren Spezies in den Komplexen, wurden die Daten aus den Einzelmolekül-Experimenten ebenfalls zeitlich aufgelöst analysiert.

Alle bis hierher dargestellten 2D-Diagramme stellen die Summen aus 2D-Diagrammen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit nahezu identischen Intensitäten dar. Die Daten der summierten Diagramme lassen sich aber nicht zeitlich aufgelöst analysieren. Daher müssen die Daten aus den einzelnen Experimenten getrennt analysiert werden. In Abbildung 3.7.2.4-1 ist der zeitliche Verlauf eines Einzelmolekül-Experimentes am Beispiel einer Messung des Komplexes $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA dargestellt. Zur besseren Trennung der beiden Spezies ist das Verhältnis F_g/F_r gegen die Zeit aufgetragen. Die Spezies, die Energietransfer zeigt, ist im unteren Teil des 2D-Diagramms, mit einem Intensitätsverhältnis $F_g/F_r < 3$, zu erkennen. Die andere Spezies zeigt ein Intensitätsverhältnis $F_g/F_r > 3$.

Für die einzelnen Experimente wurde jeweils ein solches Diagramm erstellt. Darin wurden für einen Zeitraum, der einem Viertel des gesamten gemessenen Zeitbereiches entspricht, die Ereignisse mit einem Intensitätsverhältnis $F_g/F_r < 3$ (Energietransfer) und einem Intensitätsverhältnis $F_g/F_r > 3$ (kein oder wenig Energietransfer) zu Beginn ($t = 0 - 1/4t_{\text{ges}}$), in der Mitte ($t = 3/8 - 5/8t_{\text{ges}}$) und am Ende der Messung ($t = 3/4 - 1t_{\text{ges}}$) gezählt. Beispiel: Der gesamte Zeitbereich der Messung betrug 2000 s. Dann wurden in den Zeitfenstern von 0-500s, 750-1250s und 1500-2000s die Ereignisse für die verschiedenen Spezies gezählt. Vom

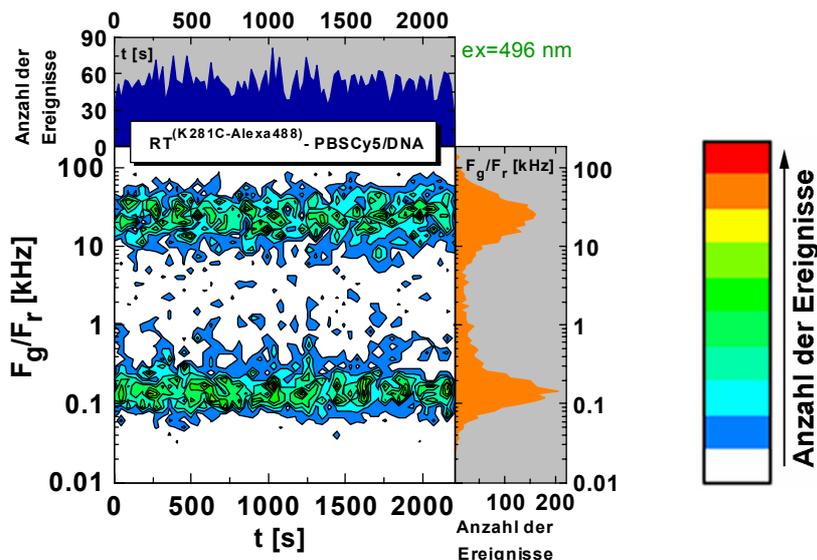


Abbildung 3.7.2.4-1: links: Auftragung des Intensitätsverhältnisses F_g/F_r , des grünen und roten Spektralbereichs. Die Histogramme zeigen die Anzahl der Ereignisse zu einem Zeitpunkt (oben) bzw. mit einem entsprechenden Intensitätsverhältnis (rechts). „ex“ gibt die in dem Experiment verwendete(n) Anregungswellenlänge(n) an. rechts: Farbcode für das zweidimensionale Diagramm.

zeitlichen Ablauf her wurden die Experimente so gestaltet, daß mit der selben Probe erst eine Messung mit Anregung bei 496 nm und 647 nm, und dann eine Messung mit Anregung bei 496 nm durchgeführt wurden. Es wurden so bis zu vier Messungen mit ein und derselben Probe direkt hintereinander durchgeführt. Daher ist eine Analyse des Verhältnisses der beiden Spezies über einen größeren Zeitraum möglich. Eine Messung dauerte im Durchschnitt 40 min.

In den Tabellen 3.7.2.4-2 bis 3.7.2.4-6 sind die Ergebnisse der kinetischen Analysen aufgeführt. Die Abbildung 3.7.2.4-2 veranschaulicht exemplarisch die in Tabelle 3.7.2.4-5 aufgeführten Werte, indem für jedes Wertepaar das dazugehörige 2D-Diagramm dargestellt ist. Die ermittelten Werte zeigen allgemein eine gewisse Variation mit der Zeit. Nichtsdestotrotz ist zu erkennen, daß der Anteil der Spezies mit $F_g/F_r < 3$, also der Anteil der Energietransfer zeigt, mit der Zeit abnimmt. Hierbei verringern sich besonders die

Absolutwerte der Spezies mit $F_g/F_r < 3$, während sich die Absolutwerte für die Spezies mit $F_g/F_r > 3$ nur geringfügig verändern. Des Weiteren sind die zeitlichen Änderungen in den Komplexen mit dem DNA/DNA-Substrat geringer als in denen mit dem DNA/RNA-Substrat. Der Anteil mit $F_g/F_r < 3$ verändert sich im Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA im Laufe der Messung von 57% auf 46%-50% und bleibt im Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA relativ konstant bei 58%. Im Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA nimmt der Anteil mit $F_g/F_r < 3$ von 58% auf 49%-55% ab. Die auffälligste Änderung zeigt der Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA. Hier verringert sich der Anteil mit $F_g/F_r < 3$, in zwei unabhängigen Experimenten, stetig von ~58% auf 27%-36%.

Tabelle 3.7.2.4-2: Zeitlicher Verlauf der Ereignisse für die zwei Spezies mit $F_g/F_r > 3$ und $F_g/F_r < 3$ in Einzelmolekül-Experimenten mit dem Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA. Gleichfarbige Felder (Weiß und Grau) kennzeichnen zeitgleich Ereignisse und sind untereinander aufgeführt. Die einzelnen Teilerperimente wurden mit den selben Probe in der angegebenen zeitlichen Abfolge durchgeführt, F_g , F_r : Intensität im grünen bzw. roten Spektralbereich.

zeitlicher Verlauf des Experimentes → → →						
	$RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA (Experiment 1)					
	Experiment 1.1			Experiment 1.2		
	$t=0-1/4t_{ges}$ (Startwerte)	$t=3/8-5/8t_{ges}$	$t=3/4-1t_{ges}$	$t=0-1/4t_{ges}$	$t=3/8-5/8t_{ges}$	$t=3/4-1t_{ges}$ (Endwerte)
Ereignisse $F_g/F_r > 3$ (% - Anteil)	235 (43%)	254 (48%)	216 (50%)	317 (54%)	306 (54%)	252 (50%)
Ereignisse $F_g/F_r < 3$ (% - Anteil)	316 (57%)	271 (52%)	217 (50%)	273 (46%)	260 (46%)	257 (50%)

Vergleicht man die aus den kinetischen Analysen ermittelten Verhältnisse der beiden Spezies mit denen aus den summierten 2D-Diagrammen (vgl. 3.7.2.2), so fällt auf daß sich die Werte aus den kinetischen Analysen insbesondere zu Beginn eines Experimentes (Startwerte) von den Werten aus den summierten 2D-Diagrammen unterscheiden.

Zusammengefaßt ist festzustellen, daß die Absolutwerte der Ereignisse für den Komplex, der Energietransfer zeigt, schneller sinken, als die für den Komplex der keinen oder nur geringen Energietransfer zeigt. Das bedeutet, daß der Komplex, der Energietransfer zeigt, schneller dissoziiert, als der Komplex der keinen oder nur geringen Energietransfer zeigt.

Tabelle 3.7.2.4-3: Zeitlicher Verlauf der Ereignisse für die zwei Spezies mit $F_g/F_r > 3$ und $F_g/F_r < 3$ in Einzelmolekül-Experimenten mit dem Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 3.7.2.4-2.

zeitlicher Verlauf des Experimentes → → →									
	$RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA (Experiment 2)								
	Experiment 2.1			Experiment 2.2			Experiment 2.3		
	t=0- 1/4t _{ges} (Start)	t=3/8- 5/8t _{ges}	t=3/4- 1t _{ges}	t=0- 1/4t _{ges}	t=3/8- 5/8t _{ges}	t=3/4- 1t _{ges}	t=0- 1/4t _{ges}	t=3/8- 5/8t _{ges}	t=3/4- 1t _{ges} (Ende)
Ereignisse $F_g/F_r > 3$ (%-Anteil)	477 (42%)	488 (47%)	484 (48%)	554 (51%)	521 (48%)	446 (44%)	412 (44%)	416 (45%)	447 (51%)
Ereignisse $F_g/F_r < 3$ (%-Anteil)	654 (58%)	556 (53%)	518 (52%)	536 (49%)	567 (52%)	557 (56%)	534 (56%)	515 (55%)	424 (49%)

Tabelle 3.7.2.4-4: Zeitlicher Verlauf der Ereignisse für die zwei Spezies mit $F_g/F_r > 3$ und $F_g/F_r < 3$ in Einzelmolekül-Experimenten mit dem Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 3.7.2.4-2.

zeitlicher Verlauf des Experimentes → → →						
	$RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA (Experiment 3)					
	Experiment 3.1			Experiment 3.2		
	t=0-1/4t _{ges} (Startwerte)	t=3/8- 5/8t _{ges}	t=3/4- 1t _{ges}	t=0- 1/4t _{ges}	t=3/8- 5/8t _{ges}	t=3/4- 1t _{ges} (Endwerte)
Ereignisse $F_g/F_r > 3$ (prozentualer Anteil)	364 (42%)	319 (41%)	338 (49%)	341 (44%)	362 (45%)	312 (42%)
Ereignisse $F_g/F_r < 3$ (prozentualer Anteil)	493 (58%)	458 (59%)	354 (51%)	436 (56%)	444 (55%)	425 (58%)

Tabelle 3.7.2.4-5: Zeitlicher Verlauf der Ereignisse für die zwei Spezies mit $F_g/F_r > 3$ und $F_g/F_r < 3$ in Einzelmolekül-Experimenten mit dem Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 3.7.2.4-2.

zeitlicher Verlauf des Experimentes → → →						
	$RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA (Experiment 4)					
	Experiment 4.1			Experiment 4.2		
	$t=0-1/4t_{ges}$ (Startwerte)	$t=3/8-5/8t_{ges}$	$t=3/4-1t_{ges}$	$t=0-1/4t_{ges}$	$t=3/8-5/8t_{ges}$	$t=3/4-1t_{ges}$ (Endwerte)
Ereignisse $F_g/F_r > 3$ (prozentualer Anteil)	219 (43%)	197 (51%)	184 (51%)	121 (49%)	116 (63%)	122 (73%)
Ereignisse $F_g/F_r < 3$ (prozentualer Anteil)	287 (57%)	193 (49%)	180 (49%)	128 (51%)	69 (37%)	44 (27%)

Tabelle 3.7.2.4-6: Zeitlicher Verlauf der Ereignisse für die zwei Spezies mit $F_g/F_r > 3$ und $F_g/F_r < 3$ in Einzelmolekül-Experimenten mit dem Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 3.7.2.4-2.

zeitlicher Verlauf des Experimentes → → →						
	$RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA (Experiment 5)					
	Experiment 5.1			Experiment 5.2		
	$t=0-1/4t_{ges}$ (Startwerte)	$t=3/8-5/8t_{ges}$	$t=3/4-1t_{ges}$	$t=0-1/4t_{ges}$	$t=3/8-5/8t_{ges}$	$t=3/4-1t_{ges}$ (Endwerte)
Ereignisse $F_g/F_r > 3$ (prozentualer Anteil)	290 (42%)	296 (54%)	276 (52%)	334 (54%)	387 (63%)	305 (64%)
Ereignisse $F_g/F_r < 3$ (prozentualer Anteil)	393 (58%)	251 (46%)	251 (48%)	280 (46%)	226 (37%)	168 (36%)

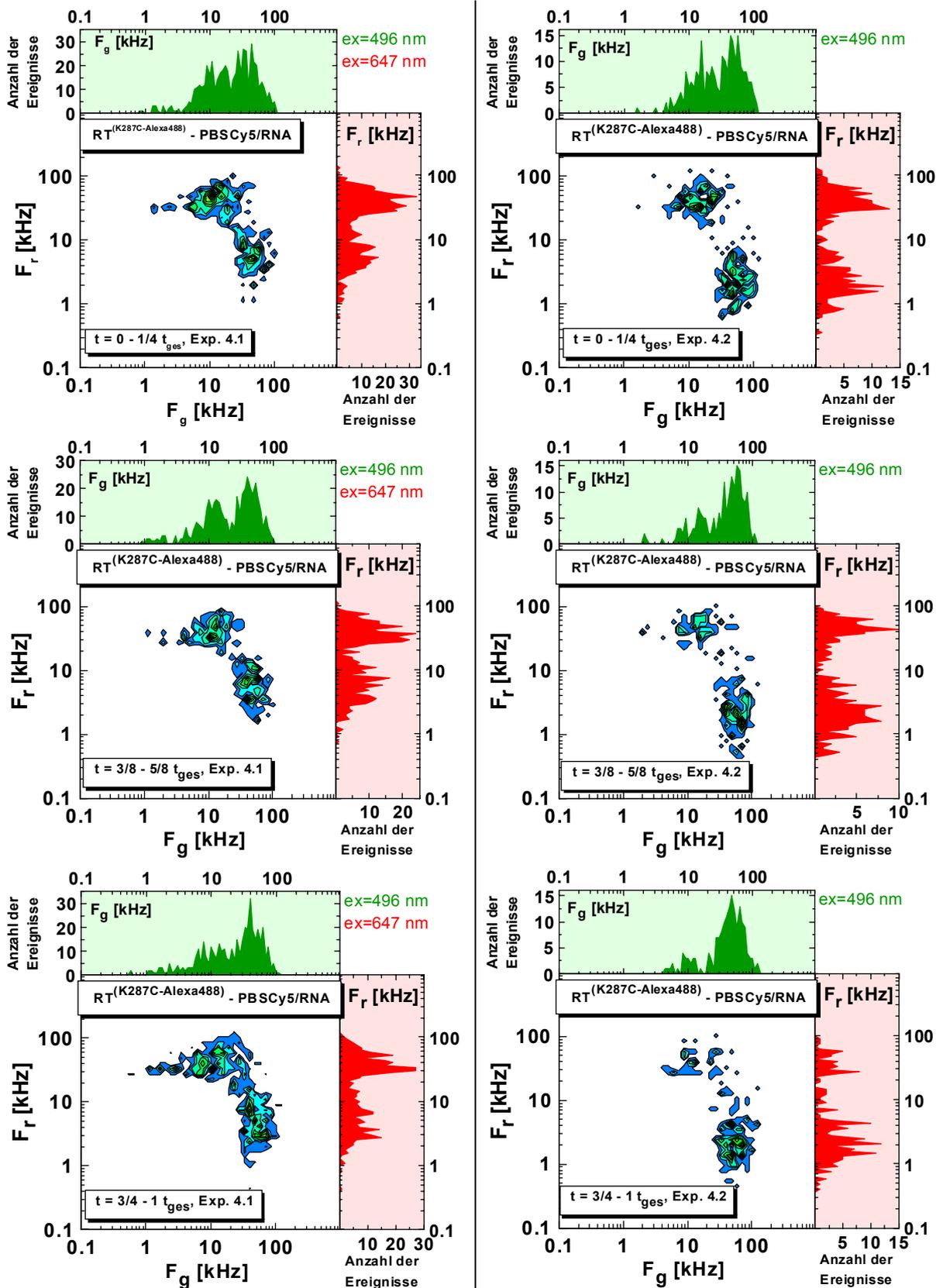


Abbildung 3.7.2.4-2: Darstellung der Wertepaare aus Tabelle 3.7.2.4-5, für den zeitlichen Verlauf des Einzelmolekül-Experimentes mit dem Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}-PBSCy5/RNA$. Das Experiment beginnt in der linken Spalte oben und endet in der rechten Spalte unten. In den Histogrammen für F_r wird die zeitliche Veränderung der Verhältnisse besonders deutlich.

4 Diskussion

4.1 Polymeraseaktivität und Substratbindungseigenschaften der RT-Mutanten

Enzymtest und Bindungsstudien zeigen, daß die Mutationen und anschließenden Markierungen mit Reportergruppen keinen großen Einfluß auf die Polymerasefunktion und Substratbindungseigenschaften des Enzyms haben. Alle verwendeten RT-Mutanten tragen die Mutationen C38S und C280S in p66 sowie C280S in p51. Darüber hinaus muß zwischen den Mutationen K281C in p51 und K287C sowie W24C in p66 unterschieden werden. Für die Mutanten RT^(K287C) und RT^(K281C) haben weder die Mutation, noch die anschließende Markierung mit einer Reportergruppe einen Einfluß auf die Polymeraseaktivität des Enzyms. Die RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivitäten der unmarkierten und markierten Mutanten RT^(K287C) und RT^(K281C) sind im Rahmen der Genauigkeit des Enzymtests nicht von der Aktivität des Wildtyp Enzyms zu unterscheiden. Dieses Ergebnis impliziert, daß die Mutationen C38S und C280S in p66 sowie C280S in p51 ebenfalls keinen Einfluß auf die RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität des Enzyms haben.

Für die Mutante RT^(W24C) konnte erst nach der Markierung mit einer Reportergruppe eine signifikant erniedrigte RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität (50% der Aktivität des Wildtyp Enzyms) festgestellt werden. In der Kristallstruktur der RT im Komplex mit einer 21/25mer DNA/DNA ist eine Wechselwirkung des natürlichen Trp24 in p66 mit dem Phosphatrückgrat des Matrizenüberhangs (n+2 und n+3) zu erkennen^[77]. Die reduzierte Polymeraseaktivität ist daher vermutlich auf eine veränderte Substrat-Wechselwirkung des Aminosäurerestes der Position 24, als Folge der Mutagenese und Markierung, zurückzuführen.

Vergleichende Gleichgewichts-Bindungsstudien mit einer fluoreszenzmarkierten DNA/DNA ergeben sehr ähnliche Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (k_D) für Wildtyp RT und die Mutante RT^(W24C, K287C). Zwar ist der k_D -Wert von 6 nM für die Mutante doppelt so hoch wie der entsprechende Wert für das Wildtyp Enzym ($k_D = 3$ nM), jedoch sollte diese um den Faktor 2 erhöhte Dissoziationsgleichgewichtskonstante keinen Einfluß auf die Substratbindung haben, besonders wenn man den für die ESR-Experimente verwendeten Konzentrationsbereich von 30 μ M – 70 μ M berücksichtigt.

In dem Konzentrationsbereich, in dem die Einzelmolekül-Experimente durchgeführt wurden (50 - 100 pM RT, 200-400 pM Primer/Matrize), war innerhalb weniger Minuten eine vollständige Dissoziation des RT-Primer/Matrize Komplexes bei einer Salzkonzentration von 80 mM KCl im Meßpuffer zu beobachten. Um die Dissoziationskonstante des RT-

Primer/Matrize Komplexes zu erniedrigen, wurde die Salzkonzentration auf 10 mM KCl gesenkt, wodurch sich die Dissoziationskonstanten um den Faktor 20 verringerten und die Halbwertszeiten für die Komplexe von 2,56 s auf 156 s erhöhten. In den Einzelmolekül-Experimenten (50 pM RT, 200 pM Primer/Matrize, 10 mM KCl im Meßpuffer), sollte trotz der verringerten Halbwertszeit eine nahezu vollständige Dissoziation über einen Zeitraum von 40 min zu beobachten sein. Da die pro Zeiteinheit detektierte Zahl an Komplexen aber nahezu unverändert blieb (vgl. 3.7.2.4), muß durch die Verringerung der Salzkonzentration die Affinität der Komplexe erhöht worden sein.

4.2 Konformation der Reversen Transkriptase von HIV-1 in Lösung

Die verfügbaren Kristallstrukturen von ligandenfreier und komplexierter RT zeigen einen besonders auffälligen Unterschied. Vergleicht man die Struktur des ligandenfreien Enzyms mit der des dsDNA-Komplexes, so erkennt man eine Rotation der Daumen-Domäne der p66-Untereinheit von 30°- 40°^[26,27]. Diese Konformationsänderung, von der geschlossenen zur offenen Form, gibt die Furche für die Bindung der Nukleinsäure frei und ermöglicht so die Anlagerung des Substrats. Zusätzliche, kleinere strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Strukturen sind in der RNaseH-Domäne zu erkennen.

Für die ligandenfreie RT wurden zwei Kristallstrukturen gelöst, die zwei unterschiedliche Konformationen des Enzyms zeigen. Die geschlossene Konformation findet man in den Strukturen, die von Rodgers et al.^[27] und Hsiou et al.^[28] gelöst wurden. Demgegenüber wurde von Esnouf et al.^[83] eine Struktur aufgeklärt, die eine offene Konformation zeigt. Jedoch wurde diese Struktur durch Herauswaschen des schwach bindenden, nicht-nukleosidischen Inhibitors HEPT aus bereits gewachsenen Kristallen erhalten. Daher ist nicht auszuschließen, daß die offene Konformation in dieser Struktur durch die Anordnung der Moleküle im Kristallverband stabilisiert wurde. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, in welcher der Konformationen (offen oder geschlossen) die HIV-1 RT in Lösung vorliegt. Dazu wurden zunächst die natürlichen Lösungsmittel-zugänglichen Cysteine, Cys280 in p51 sowie Cys38 und Cys280 in p66, mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese durch Serine ausgetauscht. Anschließend wurden mit der gleichen Methode an den Positionen 24 und 287 in p66 Cysteine eingeführt, die dann mit Spinsonden markiert wurden. Die resultierende zweifach spinmarkierte RT-Mutante konnte dann benutzt werden, um die Konformation der Daumen-/Finger-Domäne des ligandenfreien und komplexierten Enzyms mittels ESR-Spektroskopie zu untersuchen.

HIV-1 RT im Komplex mit dem pseudoknot-RNA-Inhibitor

In einem ersten Experiment wurden die Abstände der Spinsonden in RT gebunden an einen pseudoknot-RNA-Inhibitor analysiert. Dieses RNA Aptamer wurde ursprünglich durch die SELEX Methode identifiziert^[84]. Kürzlich wurde auch die Röntgen-Kristallstruktur des Komplexes mit der HIV-1 RT aufgeklärt^[29]. In der Struktur kann man erkennen, daß die RNA-Bindestelle zwischen den aktiven Zentren der Polymerase- und der RNaseH-Domäne liegt und dadurch einen Teil der Bindungsfurche für das natürliche Substrat überdeckt. Ein Vergleich der Kristallstrukturen des pseudoknot-RNA- und dsDNA-Komplexes der RT^[26,77] zeigt, daß die RNA eine größere Anzahl von Wechselwirkungen mit dem Enzym aufweist als das natürliche Substrat. Die doppelsträngige DNA zeigt überwiegend Wechselwirkungen in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne (Finger- und Daumen-Domäne in p66) und mit der RNaseH-Domäne. Die pseudoknot-RNA weist neben Wechselwirkungen mit ähnlichen Regionen in p66 zusätzliche Kontakte mit der kleineren p51-Untereinheit auf. Dadurch ist die RNA sehr fest an das Protein gebunden, wohingegen die dsDNA scheinbar über die Furche für die Nukleinsäure-Bindung gleitet. Die große Anzahl von Wechselwirkungen zwischen RNA und RT erklären auch den durch Bindungsstudien ermittelten außergewöhnlich niedrigen k_D von ~ 25 pM und die darüber hinaus sehr spezifische Wechselwirkung des Inhibitors mit der HIV-1 RT^[85]. Die geschlossene Konformation der RT im Komplex mit der pseudoknot-RNA wird durch intensive elektrostatische Wechselwirkungen der RNA mit verschiedenen basischen Aminosäureresten der Helix I in der Daumen-Domäne von p66 stabilisiert. Aus der Kristallstruktur der ligandenfreien RT^[27] kann nicht abgeleitet werden, ob die geschlossene Konformation auch in Lösung vorliegt, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß diese Struktur durch die Wechselwirkung der Proteine im Kristallverband induziert und/oder stabilisiert wird. Daher ist auch nicht klar, ob die pseudoknot RNA für die geschlossene Konformation der RT selektiert wurde, wie von Jäger et al.^[29] vorgeschlagen. Alternativ dazu könnten die Protein-RNA-Wechselwirkungen die geschlossene Konformation induziert haben. Um diese Frage zu klären, wurden Abstandsbestimmungen zwischen zwei Spinsonden in den Spitzen der Daumen- und Finger-Domäne der RT-Mutante RT^(W24C-R1, K287C-R1) mittels ESR-Spektroskopie durchgeführt. Die Analysen der ESR-Spektren der Mutante im Komplex mit der pseudoknot RNA ergeben einen Abstand von 11 Å – 14 Å, abhängig von der Temperatur, zwischen den Spinsonden an Cys24 und Cys287 in p66, in Lösung. Der Abstand kann nicht genauer angegeben werden, da sich die dipolaren Wechselwirkungen mit steigender Temperatur teilweise ausmitteln. Jedoch stimmt dieser Wert sehr gut mit dem Abstand von

11,9 Å zwischen den C_β-Atomen von Trp24 und Lys287 in der Kristallstruktur des RT-pseudoknot-RNA Komplexes überein. Des Weiteren ist die Linienform der Spektren der ligandenfreien und pseudoknot RNA gebundenen RT bei 294 K nahezu identisch, weshalb auch die Konformationen des Enzyms sehr ähnlich sein muß. Dies zeigt zum ersten Mal, daß die ligandenfreie RT in Lösung bei 294 K zum größten Teil in der geschlossenen Konformation vorliegt. Daraus kann man ableiten, daß die pseudoknot RNA während der SELEX-Prozedur für die geschlossene Form der RT selektiert wurde. Die Selektion für die geschlossene Konformation bedeutet gleichzeitig, daß weder im Enzym, noch in der RNA größere Konformationsänderungen durch die Komplexbildung stattfinden. Dies kann als einer der Gründe für die außergewöhnlich kleine Dissoziationskonstante bzw. hohe Affinität dieses Komplexes angeführt werden.

Anhand von temperaturabhängigen Messungen konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die für den RT-pseudoknot-RNA Komplex bestimmten Abstände innerhalb des beobachteten Temperaturbereiches (170K – 313K) konstant waren, was im Gegensatz zu den Ergebnissen für das ligandenfreie Enzym steht (siehe unten). Das zeigt sehr deutlich, daß der RNA Inhibitor das Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Form durch Fixierung der Daumen-Domäne in der geschlossenen Konformation verschiebt. Neben der teilweisen Besetzung der Bindungsfurche stabilisiert der Inhibitor zusätzlich eine Konformation, welche es dem Nukleinsäure-Substrat unmöglich macht in produktive Wechselwirkung mit dem Enzym zu treten.

HIV-1 RT im Komplex mit dsDNA

In weiteren Experimenten wurde die Konformation der RT im Komplex mit einem 18/36mer DNA/DNA Substrat untersucht, wiederum mit Hilfe der zweifach spinmarkierten Mutante RT^(W24C-R1, K287C-R1). Bislang wurden zwei verschiedene Kristallstrukturen der HIV-1 RT im Komplex mit dsDNA aufgeklärt. Eine zeigt die RT gebunden an eine 18/19mer DNA/DNA^[26]. Die zweite Struktur besteht aus einer 21/25mer DNA/DNA, die kovalent mit der RT verknüpft ist und zusätzlich ein dTTP am aktiven Zentrum der Polymerase-Domäne gebunden hat. Im Vergleich zu dem Komplex ohne dTTP ist die Finger-Domäne (in p66) im Komplex mit dTTP in Richtung der Daumen-Domäne gebogen, was zu einer Verringerung des Abstandes der C_β-Atome von Trp24 (Finger) und Lys287 (Daumen) um 6 Å, von 35 Å auf 29 Å führt. Die Analyse der ESR-Spektren der spinmarkierten Mutante RT^(W24C-R1, K287C-R1) im Komplex mit dem 18/36mer in gefrorener Lösung, liefert einen mittleren Abstand der Spins von 19 Å. Berücksichtigt man die Länge der Spinsonden-Seitenketten von 7 Å, an

deren Ende sich das freie Elektron befindet, und nimmt man gleichzeitig an, daß die Spinsonden aufeinander zeigen, so ergibt sich in maximaler Abstand der C_β-Atome von Cys24 und Cys287 von 33 Å. Daher erscheint in der gefrorenen Lösung der Abstand der Daumen- und Finger-Domäne eher dem zu entsprechen, der in dem RT-dsDNA-dTTP Komplex gefunden wurde.

Die Raumtemperatur-ESR-Spektren der zweifach und einfach spinmarkierten RT im Komplex mit dem 18/36mer sind nahezu identisch. Daher muß die Linienverbreiterung, die sich aus Spin-Spin Wechselwirkung resultiert, kleiner als 0,2 Gauss sein, was einem Interspinabstand von mehr als 20 Å entspricht (vgl. 2.5.1.4). Dieses Ergebnis stimmt mit einer offenen Konformation der Komplexe in Lösung überein, die auch durch die Tieftemperatur-Messungen ermittelt wurde.

Temperaturabhängigkeit der Konformation der ligandenfreien HIV-1 RT

Die ESR-Spektren der zweifach markierten, ligandenfreien RT bestehen aus zwei Komponenten, die identisch mit den Linienformen der Spektren der RT-pseudoknot-RNA und -dsDNA Komplexe sind. Die für die Messungen verwendete perdeuterierte ¹⁵N-MTS-Spinsonde besitzt eine geringe intrinsische Linienbreite, die zusammen mit der starken dipolaren Verbreiterung der Spektren eine gute Trennung der beiden Komponenten ermöglicht. Die Analyse der Population der beiden Komponenten zeigt, daß bei tiefen Temperaturen (273 K) 35% der RT in der offenen Konformation vorliegen. Erhöht man die Temperatur, so verringert sich der Anteil der Komponente, die eine offenen Konformation zeigt. Bei physiologischen Temperaturen (313 K) zeigen 95% aller Moleküle eine geschlossene Konformation. Der für diese geschlossene Konformation in Lösung abgeschätzte Abstand der Daumen- und Finger-Domäne stimmt mit dem in der Kristallstruktur^[27] überein. Aus der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten konnte eine Reaktionsenthalpie von 34,5 kJ/mol für den Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation berechnet werden. Die Entropiedifferenz der Konformationen beträgt 134 J/(mol·K).

Alle ESR-Spektren der ligandenfreien RT konnten im betrachteten Temperaturbereich durch deckungsgleiche Mischspektren aus den Spektren der offenen und geschlossenen Konformation dargestellt werden. Daraus kann man folgern, daß Konformationen mit anderen Interspinabständen als in der offenen oder geschlossenen Konformation nicht vorliegen, oder daß diese kurze Lebensdauern aufweisen. Versuche die Konformationen der ligandenfreien RT durch schockgefrieren von 273 K auf 170 K zu fixieren, resultierten in der offenen

Konformation als überwiegende Komponente. Daher muß die Übergangsrate zwischen der offenen und geschlossenen Konformation schnell sein, verglichen mit der Abkühlgeschwindigkeit von $\sim 50\text{K/s}$.

Konformation von RT-NNRTI Komplexen in Lösung

Die Komplexe der HIV-1 RT mit den nicht-nukleosidischen Inhibitoren Nevirapine^[31] und S-TIBO^[30] zeigen in den Röntgen-Kristallstrukturen eine offene Konformation. Vergleicht man ESR-Spektren der doppelt spinmarkierten RT im Komplex mit den NNRTIs, mit Superpositionen der Spektren der einfach spinmarkierten Enzyme, so ergeben sich keine Hinweise auf Spin-Spin-Wechselwirkungen. Daher liegt die RT in Komplexen mit Nevirapine und S-TIBO in Lösung bei 294K in der offenen Konformation vor. Diese muß durch die Inhibitoren stabilisiert sein.

4.3 Analyse der Konformation von RT-Primer/Matrize Komplexen mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie

Detaillierte Informationen über die Struktur von RT-Primer/Matrize Komplexe geben zwei unterschiedliche Röntgen-Kristallstrukturen von RT-DNA/DNA Komplexen. Eine zeigt die RT, gebunden an eine 18/19mer DNA/DNA, in einem ternären Komplex mit dem Fab Fragment Fab28 (vgl. Abbildung 1.5-1)^[26]. Die Kristalle dieses Komplexes wurden in Abwesenheit der Nukleinsäure, durch Kokristallisation der RT und des Fab Fragmentes hergestellt. Anschließend wurden die Kristalle in eine Lösung mit der DNA/DNA überführt, so daß diese durch Diffusion in die Kristalle gelangen und sich an die RT anlagern konnte^[86]. Die zweite Röntgen-Kristallstruktur stellt den Komplex aus RT und einer 25/21mer DNA/DNA dar, in dem die Nukleinsäure über eine Disulfid-Brücke kovalent an das Enzym gebunden ist. Der 21mer Primerstrang der Primer/Matrize ist am 3'-Ende mit einem Didesoxynukleotid terminiert. Dies ermöglicht die Bindung eines dNTPs, hier eines dTTPs, am aktiven Zentrum der Polymerase-Domäne, ohne daß dieses in den Primerstrang eingebaut werden kann.

Für die Kristallisation der RT-DNA/DNA Komplexe mußte die Komplexbildung von RT und Nukleinsäure in beiden Fällen auf unnatürliche Weise herbeigeführt werden. Die ermittelten Strukturen stellen daher vermutlich nicht, oder nur zum Teil, die realen Anordnungen von RT und Nukleinsäure in Lösung dar. Für das ligandenfreie Enzym konnte durch die ESR-Experimente bereits gezeigt werden, daß die in der Kristallstruktur vorliegende Konformation nur zum Teil den realen Konformationen in Lösung entspricht (vgl. 4.2). Die Vermutung, daß

RT-Primer/Matrize Komplexe in Lösung auch noch andere Konformationen annehmen kann als die, die in den Kristallstrukturen vorliegen, wird von Untersuchungen zur Substratbindung von HIV-1 RT untermauert (vgl. 1.6). Hierbei wurde in Pre-Steady-State Analysen die Geschwindigkeit der Substratbindung untersucht, wobei der Nukleotideinbau als Signal für die Substratbindung diente. Dadurch konnten drei verschiedenen Geschwindigkeiten für die Komplexbildung nachgewiesen werden. Diese drei Geschwindigkeiten wurden in einem Modell (Abbildung 1.6-1) drei RT-Substrat Komplexen mit unterschiedlichen Konformationen zugeordnet. Dieses Modell zeigt einen weit komplexeren Mechanismus der Wechselwirkung von Polymerasen mit Nukleinsäure-Substraten als bislang angenommen. Um dieses Modell aus struktureller Sicht zu beleuchten, wurden in dieser Arbeit RT-Primer/Matrizen Komplexe auf die räumliche Anordnung von Substrat und Protein hin untersucht. Als Methode wurde die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit FRET verwendet.

Um durch FRET-Messungen Aussagen über die räumliche Anordnung eines Systems treffen zu können, benötigt man ein Donor/Akzeptor-System, in dem sich die beiden Fluorophore an definierten Stellen, die einen gewissen Abstand haben, befinden (vgl. 2.5.2.2). Um die relative Anordnung von RT und Substratmolekülen in einem RT-Substrat Komplex zu untersuchen, muß die RT wie auch das Substrat einen der beiden Fluorophore des Donor/Akzeptor-Systems tragen. Zur Fluoreszenzmarkierung der RT wurden zunächst die natürlichen Lösungsmittel-zugänglichen Cysteine, Cys280 in p51 sowie Cys38 und Cys280 in p66, mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese durch Serine ausgetauscht. Anschließend wurden mit der gleichen Methode, getrennt voneinander, an den Positionen 287 in p66 und 281 in p51 Cysteine eingeführt, die dann mit dem Donor Alexa488 markiert wurden. Die resultierenden einfach markierten RT-Mutanten RT^(K281C-Alexa488) und RT^(K287C-Alexa488) konnten dann für die Einzelmolekül-FRET-Experimente benutzt werden. Der für die Messungen verwendete, am 5'-Ende mit dem Akzeptor Cy5 markierte DNA-Primerstrang, wurde mit einem 35mer DNA- bzw. RNA-Matrizenstrang hybridisiert. Daraus ergaben sich die in dieser Arbeit verwendeten Primer/Matrizen PBSCy5/DNA und PBSCy5/RNA. Die 35mer RNA wurde durch *in vitro*-Transkription hergestellt.

Aus den kinetischen Untersuchungen zur Substratbindung geht hervor, daß eine Teil der Komplexe in einer Konformation vorliegt, die erst nach Dissoziation und nachfolgender Reassoziations Nukleotide in den RT-Primer/Matrizen Komplex einbauen kann^[33]. Dieser Komplex wird als „dead end“-Komplex bezeichnet. Für diesen Komplex wird eine Anordnung von RT und Substrat vermutet, in der sich das 5'-Ende des Primerstranges in der

Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne befindet. Die Vermutung beruht darauf, daß die Furche in der das Substrat bindet, aufgrund ihrer Ladungseigenschaften geeignet sein sollte, das Substrat auch in einer umgedrehten Orientierung zu binden. Ausgehend von dieser Hypothese wurden die Positionen für die Fluoreszenzmarkierung der RT so ausgewählt, daß sich deutlich unterschiedliche Effizienzen für den Energietransfer zwischen dem Donor an der RT und dem Akzeptor an der Primer/Matrize, für die verschiedenen Orientierungen ergeben sollten (vgl. 3.7).

RT im Komplex mit DNA/DNA

In Einzelmolekül-Experimenten wurden die RT-DNA/DNA Komplexe $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA und $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA untersucht. Für beide Komplexe liefert die Analyse der Daten aus den Experimenten mit direkter Anregung des Donors (496 nm) 2D-Diagramme der Auftragung F_r gegen F_g , in denen zwei klar separierte „Inseln“ zu erkennen. Die Zentren der Inseln weisen dementsprechend deutlich voneinander unterscheidbare Fluoreszenzintensitäten für den grünen und roten Spektralbereich bzw. die Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz auf. Einer Insel in einem 2D-Diagramm ist jeweils eine Spezies mit bestimmten Fluoreszenzintensitäten zuzuordnen.

Für den Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA konnte eine Spezies identifiziert werden, die eine um 85% reduzierte Donor-Fluoreszenz aufweist, die mit einer stark erhöhten Akzeptor-Fluoreszenz einher geht. In diesem Komplex hat demzufolge ein Energietransfer mit einer Effizienz von mehr als 75% stattgefunden. Unter Berücksichtigung eines Försterradiuses von 51 Å, kann man auf einen Maximalabstand zwischen Donor und Akzeptor von 45 Å schließen (vgl. 2.5.2.2). Dieser Abstand zwischen dem 5'-Ende des Primers und der Position 281 in p51, stimmt gut mit dem aus den Kristallstrukturen abgeschätzten Abstand von 40 Å (vgl. 3.7), für die in den Kristallstrukturen vorliegende Konformation der RT-Primer/Matrize Komplexe, überein. Da der Energietransfer für diesen Komplex sehr hoch ist, führen kleine Abstandsänderungen in diesem Abstandsbereich auch nur zu kleinen Änderungen in der Transfereffizienz. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich in dieser Spezies mehrere Konformationen des Komplexes verbergen, die aufgrund geringer Abstandsdifferenzen nicht aufgelöst werden können.

Die zweite für den Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA identifizierte Spezies weist Intensitäten auf, die geringfügig höher sind als die der ligandenfreien $RT^{(K281C-Alexa488)}$. Durch eine Koinzidenzanalyse konnte jedoch gezeigt werden, daß diese Spezies nicht aus dem ligandenfreien Enzym sondern aus dem Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA besteht

(3.7.2.2). Aufgrund der geringen Intensitätsunterschiede zum ligandenfreien Enzym, kann für diese Spezies nicht entschieden werden, ob Energietransfer stattgefunden hat oder nicht. Daher ist in dieser Konformation des Komplex der Akzeptor am 5'-Ende des Primers mindestens 80 Å vom Donor am Cys281 in p51 entfernt. Damit könnte dieser Komplex in einer Konformation vorliegen, in der sich daß 5'-Ende des Primerstranges in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne befindet. Um dies zu überprüfen kann man die Messungen mit dem Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA heranziehen, da sich hier die fluoreszenzmarkierte Stelle des Enzyms in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne befindet. Der Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA zeigt eine Spezies mit einer um 60% reduzierten Donor-Fluoreszenz, was einem Abstand zwischen den Fluorophoren von maximal 50 Å entspricht. Die zweite Spezies, die für diesen Komplex identifiziert werden konnte, zeigt keinen oder nur sehr geringen Energietransfer, woraus man einem Abstand zwischen den Fluorophoren von mindestens 80 Å ableiten kann. Grundsätzlich ist anzunehmen, daß sich die Substratbindung in den Komplexen $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA und $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA nicht oder nur unwesentlich unterscheidet. Deshalb kann man auch für den Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA erwarten, das eine der Spezies in der Konformation bindet, in der sich das 3'-Ende des Primerstranges, wie im Komplex $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA, in der Nähe der aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne befindet. Diese Konformation muß daher der Spezies des Komplexes $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA zugeordnet werden, die eine um 60% reduzierte Donor-Fluoreszenz aufweist, was einem Abstand zwischen den Fluorophoren von maximal 50 Å entspricht. Der für diese Konformation aus der Kristallstruktur abgeschätzte Abstand beträgt 40 Å und stimmt damit gut mit dem aus den Fluoreszenzintensitäten abgeschätzten Abstand überein. Würde das 3'-Ende des Primerstranges in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne binden, sollte der Abstand zwischen den Fluorophoren ~30 Å betragen, woraus eine Transfereffizienz von mehr als 90% resultiert. Eine Spezies mit einer Transfereffizienz von mehr als 90% ist aber nicht erkennbar. Demgegenüber findet man eine zweite Spezies, die keinen oder nur sehr geringen Energietransfer zeigt, was einem Abstand zwischen dem Akzeptor am 5'-Ende des Primerstranges und dem Donor an der Position 287 in p66 von mindestens 80 Å entspricht. Bilanzierend kann man aus den Messungen der Komplexe $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA und $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA feststellen, daß in Lösung mindestens zwei RT-DNA/DNA Komplexe mit unterschiedlichen Konformationen existieren. Dabei entspricht eine Konformation der, die in den Kristallstrukturen der RT-DNA/DNA Komplexe vorliegt.

Die zweite Konformation unterscheidet sich deutlich von der ersten, jedoch kann für diese Konformation keine genaue Lokalisation der Nukleinsäure auf der RT angegeben werden.

RT im Komplex mit DNA/RNA

Das für die Einzelmolekül-Experimente verwendete DNA/RNA-Substrat PBSCy5/RNA ist sequenzidentisch zu dem DNA/DNA-Substrat PBSCy5/DNA.

Die Messungen mit den beiden Komplexen $RT^{(K281C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA und $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA zeigen, daß auch in RT-DNA/RNA Komplexen mindestens zwei unterschiedliche Konformationen differenziert werden können. Diese Konformationen sind im Wesentlichen identisch mit denen, die für die RT-DNA/DNA Komplexe gefunden wurden. Ein signifikanter Unterschied ist jedoch für die Spezies die Energietransfer zeigt zu erkennen, wenn man die Fluoreszenzintensitäten für die DNA/DNA und DNA/RNA Komplexe der $RT^{(K287C-Alexa488)}$ vergleicht. Für den Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/DNA weist diese Spezies mittlere Intensitäten von $F_g/F_r = 19,75 \text{ kHz}/25,21 \text{ kHz}$, bei direkter Anregung des Donors (496 nm) auf. Im Komplex $RT^{(K287C-Alexa488)}$ -PBSCy5/RNA betragen diese mittleren Intensitäten $F_g/F_r = 12,11 \text{ kHz}/36,39 \text{ kHz}$. Da im Komplex mit DNA/RNA die Intensitäten im grünen Spektralbereich $\sim 7 \text{ kHz}$ niedriger und im roten Spektralbereich $\sim 11 \text{ kHz}$ höher sind, ist der Energietransfer im Komplex mit DNA/RNA größer als im Komplex mit DNA/DNA. Der höhere Energietransfer für den Komplex mit DNA/RNA bedeutet, daß der Abstand vom 5'-Ende des Primerstranges zum Cys287 in p66 kleiner ist als im vergleichbaren Komplex mit DNA/DNA. Bei angenommener gleicher Position des 3'-Endes des Primers am aktiven Zentrum der Polymerase-Domäne weisen die Abstandsunterschiede auf eine gestauchte Konformation des DNA/RNA-Hybrid im Vergleich zum DNA/DNA-Substrat hin. Von DNA/RNA-Hybriden ist bekannt, daß sie eine Konformation ähnlich der der A-Form DNA annehmen^[87]. In der A-Form beträgt die Höhe pro Basenpaar $2,3 \text{ \AA}$, während sie in der B-Form $3,4 \text{ \AA}$ mißt. In der Kristallstruktur der RT-DNA/DNA Komplexe kann man erkennen, daß das an die RT gebundene DNA/DNA-Substrat in der Polymerase-Region (BP 1 - 4) eine der A-Form ähnliche Konformation annimmt^[77]. Von BP 5 nach BP 11 verändert sich die Konformation allmählich zu B-Form. Damit entspricht die Form eines an die RT gebundenen DNA/DNA-Substrates eher der B-Form, während die des DNA/RNA-Substrates eher der A-Form ähnelt.

Meßergebnisse im Vergleich mit dem kinetischen Modell zur Substratbindung von HIV-1 RT

Das Modell des kinetischen Mechanismus der HIV-1 RT-Substrat-Wechselwirkung (vgl. 1.6) postuliert drei verschiedene Konformationen von RT-Primer/Matrize Komplexen. In einem sogenannten produktiven Komplex können Nukleotide mit einer Geschwindigkeit von 20-60 s⁻¹ eingebaut werden. In einem unproduktiven Komplex können erst nach einer Konformationsänderung Nukleotide eingebaut werden. Ein zweiter unproduktiver Komplex kann erst nach Dissoziation und anschließender Reassoziierung in den produktiven Komplex übergehen („dead end“-Komplex).

Für den produktiven Komplex muß man annehmen, daß die Konformation der des katalytischen Komplexes aus der Kristallstruktur der RT mit einer 21/25mer DNA/DNA und gebundenem dNTP sehr ähnlich ist. Hier befindet sich das 3'-Ende des Primerstranges am aktiven Zentrum der Polymerase-Domäne. Eine der durch die Einzelmolekül-Experimente identifizierten Konformationen für RT-Primer/Matrize Komplexe könnte damit der des produktiven Komplexes entsprechen, da auch für diese gezeigt werden konnte, daß das 3'-Ende in der Nähe des Primerstranges bindet.

Für den unproduktiven Komplex steht fest, daß er durch eine Konformationsänderung in den produktiven Komplex übergeht. Über die Konformation dieses Komplexes kann man bislang nur spekulieren. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist auch in diesem Komplex das Substrat bereits so in der Furche für die Nukleinsäure gebunden, daß das 3'-Ende des Primerstranges zum aktiven Zentrum der Polymerase-Domäne orientiert ist. Andernfalls müßte dieser Komplex dissoziieren, bevor er Nukleotide einbauen kann. Der Vergleich der Einzelmolekül-Experimente der Komplexen RT^(K287C-Alexa488)-PBSCy5/DNA und RT^(K287C-Alexa488)-PBSCy5/RNA haben gezeigt, daß die unterschiedlichen Konformationen der Nukleinsäure-Substrate bereits signifikant unterschiedliche Intensitäten für die Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz liefern. Für die Konformation, in der das 3'-Ende des Primerstranges zum aktiven Zentrum orientiert ist, kann jedoch nur eine definierte Spezies identifiziert werden, die auch dem produktiven Komplex entsprechen könnte (s.o.). Daraus läßt sich ableiten, daß sich die Konformationen des produktiven und des unproduktiven Komplexes nur geringfügig in der Position des 3'-Endes des Primerstranges am dem aktiven Zentrum der Polymerase-Domäne unterscheiden.

Der dritte in dem kinetischen Modell postulierte Komplex, der „dead end“-Komplex, muß nach den vorangegangenen Überlegungen der zweiten in den Einzelmolekül-Experimenten identifizierten Spezies entsprechen. Diese Spezies weist Fluoreszenzintensitäten auf, die denen der ligandenfreien RT-Mutanten sehr ähnlich sind. Diese Intensitäten können allenfalls

einem sehr geringen Energietransfer ($< 5\%$) zugeordnet werden. Jedoch konnte durch Koinzidenzanalysen gezeigt werden, daß es sich bei dieser Spezies um RT-Primer/Matrize Komplexe aus fluoreszenzmarkiertem Enzym und fluoreszenzmarkierter Nukleinsäure handelt. Damit ist das 5'-Ende des Primerstranges mindestens 80 \AA von den Fluorophoren an den Positionen 287 in p66 und 281 in p51 entfernt. Diese Abstandsinformationen geben Hinweise darauf, daß das Substrat im „dead end“-Komplex nicht in der Bindungsfurche für die Nukleinsäure lokalisiert ist. Dies könnte erklären, warum der „dead end“-Komplex erst dissoziieren muß, bevor er in den produktiven Komplex übergehen kann. Es fällt jedoch schwer, aufgrund der Abstandsinformationen eine Orientierung der Nukleinsäure in diesem Komplex anzugeben. Vorstellbar ist eine Bindung des Substrates senkrecht zur Bindungsfurche für die Nukleinsäure, in der Finger-Domäne von p51, wobei das 5'-Ende des Primerstranges außerhalb des Proteins lokalisiert ist.

Die kinetischen Untersuchungen zur Substratbindung haben auch gezeigt, daß die Bindung unterschiedlicher Substrate, DNA/DNA bzw. DNA/RNA, zu einer unterschiedlichen Verteilungen zwischen dem produktiven, dem unproduktiven und dem „dead end“-Komplex führen. So konnte für DNA/RNA-Substrate eine Verteilung zwischen produktivem+unproduktiven Komplex und dem „dead-end“-Komplex von (80-90):(20-10) gefunden werden^[33]. Für DNA/DNA-Substrate wurde ein Verhältnis von (50-70):(50-30) bestimmt. Aus den Untersuchungen in dieser Arbeit geht hervor, daß die Verteilung zwischen produktivem+unproduktiven Komplex und dem „dead-end“-Komplex, sowohl für DNA/DNA als auch für DNA/RNA zu Beginn einer jeden Einzelmolekül-Messung ca. 60:40 betrug. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß im Verlauf einer Messungen der „dead-end“-Komplex deutlich langsamer dissoziierte als der produktive bzw. unproduktive Komplex. Nimmt man an, daß die Assoziationsraten für alle Komplexe ähnlich sind, führt die kleinere Dissoziationskonstante des „dead-end“-Komplexes zu einer kleineren Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für diesen Komplex. Die im Vergleich zu den anderen Komplexen kleinere Dissoziationsgleichgewichtskonstante des „dead-end“-Komplexes kann durch die in den Experimenten im Meßpuffer enthaltene, sehr niedrige Salzkonzentration von 10 mM KCl und 6 mM MgCl_2 , induziert worden sein. Dies könnte erklären, warum in dieser Arbeit in den Messungen für die RT-DNA/RNA-Substrate ein größerer Anteil an „dead-end“-Komplex als in den anderen Arbeiten gefunden wurde, in denen der Meßpuffer 50 mM KCl und 10 mM MgCl_2 enthielt^[33].

4.4 Zusammenfassung

Die Konformationsanalyse von HIV-1 RT mittels ESR-Spektroskopie, in Kombination mit zweifach spinmarkiertem Enzym zeigt erstmalig, daß die ligandenfreie RT in Lösung in einem temperaturabhängigen Gleichgewicht zwischen zwei definierten Konformationen, einer offenen und einer geschlossenen, vorliegt. Die maßgeblich für die Konformationsänderung verantwortliche Daumen-Domäne nimmt bei physiologischen Temperaturen die geschlossene Form ein. Demgegenüber ist bei tiefen Temperaturen (170K) die offene Konformation bevorzugt. Konkrete Aussagen hinsichtlich der biologischen Funktion dieser Domänenbewegung zu machen ist allerdings schwierig. Die durch die vorliegenden Experimente erstmals gezeigte, hohe Flexibilität dieser Domäne in Lösung, in Kombination mit Röntgenstrukturdaten legen jedoch nahe, daß sie an der Translokation des Nukleinsäure-Substrats während der Polymerisationsreaktion beteiligt sein könnte. Weiterhin haben die ESR-Strukturanalysen gezeigt, daß der mit Hilfe der SELEX Methode identifizierte pseudoknot-RNA-Inhibitor für die geschlossene Konformation der RT selektiert wurde. Dies kann als ein Grund für die extrem feste Bindung des Inhibitors zur RT angeführt werden.

Die Einzelmolekül-FRET-Experimente zeigen zum ersten Mal durch die strukturelle Analyse einzelner RT-Nukleinsäure Komplexe in Lösung, daß die RT-Primer/Matrize Komplexe mindestens zwei eindeutig unterschiedliche Konformationen annehmen. Des Weiteren wird durch die Ergebnisse der Einzelmolekül-FRET-Experimente das vorgestellte kinetische Modell^[33] vollständig unterstützt. Die Experimente belegen die Existenz des postulierten „dead end“-Komplexes und geben Hinweise darauf, daß in diesem Komplex das Substrat nicht in der Nukleinsäurebindungsfurche lokalisiert ist. Des weiteren kann man aus den Einzelmolekül-Untersuchungen schließen, daß sich die Konformationen des produktiven und unproduktiven Komplexes nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Dies unterstützt die dem Modell zu Grunde liegende Theorie, daß sich die Struktur der Nukleinsäuren im produktiven und unproduktiven Komplex nur in den ersten Basen, in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase-Domäne, unterscheiden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine hohe intrinsische Flexibilität der RT und die Existenz unterschiedlicher RT-Nukleinsäure Komplexe in Lösung. Diese konformationelle Heterogenität kann als Grund für die sehr schwierige Kristallisation der RT angeführt werden, wie sie in den letzten 15 Jahren von allen mit diesem Themenkomplex beschäftigten Laboren beobachtet wurde.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Testsysteme zur Konformationsanalyse der RT und ihrer Nukleinsäure-Komplexe, stellen methodische Weiterentwicklungen in der ESR-Spektroskopie

und der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie dar. So konnte durch die erstmalige zweifache Spinmarkierung eines Enzyms mit der perdeuterierten ^{15}N -Spinsonde MTSL- ^{15}N - d_{15} , eine ausgesprochen gute Trennung dipolar verbreiteter ESR-Spektren von unverbreiterten Spektren erreicht werden. Dadurch konnten verschiedene Konformationen der RT in Lösung identifiziert und vor allem quantifiziert werden. Durch die ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung von RT und Nukleinsäure-Substrat konnte, in Kombination mit der Methode der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie, zum ersten Mal durch Einzelmolekül-FRET-Experimente zwischen verschiedenen Konformationen eines Enzym-Substrat-Komplexes unterschieden werden.

Das Potential der in dieser Arbeit etablierten Testsysteme für die RT, in Verbindung mit den verwendeten Methoden, erlaubt in Zukunft eine Vielzahl von weiterführenden Experimenten.

4.5 Ausblick

Weiterführende ESR-Experimente könnten die kinetische Analyse der Wechselwirkung zwischen RT und einem, ebenfalls spinmarkierten, Nukleinsäure-Substrat einschließen. Vorstellbar ist die Verknüpfung von Stopped-Flow, Druck- oder T-Sprung-Methoden mit der ESR-Spektroskopie. Hieraus können potentiell Erkenntnisse über den Mechanismus der Nukleinsäure-Translokation während der Polymerisation gewonnen werden. Untersucht man mit diesen Methoden gegen RT-Inhibitoren resistente Mutanten, sind potentiell auch Einsichten in die bisher wenig verstandenen Mechanismen der Resistenzen zu erwarten.

In zukünftigen Einzelmolekül-FRET-Experimenten könnte die Struktur von RT im Komplex mit Nukleinsäure-Substraten, die für die reverse Transkription weitere essentielle Basensequenzen enthalten (z.B. PPT), analysiert werden. Hieraus sind potentiell Erkenntnisse über den Mechanismus der reverse Transkription zu erwarten.

Eine Immobilisierung von RT oder Nukleinsäure auf geeigneten Oberflächen würde einen weiteren Fortschritt in den Einzelmolekül-FRET-Experimenten bedeuten. Hierdurch können schnelle Kinetiken mit strukturellen Informationen direkt verknüpft werden. Diese Experimente könnten einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der Nukleinsäure-Translokation während der Polymerisationsreaktion liefern.

5 Literatur

- [1] Rous, P. (1911). Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *J. Exp. Med.* **13**, 397.
- [2] Varmus, H. (1988). Retroviruses. *Science* **240**, 1427-35.
- [3] Stefelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. und Vogt, P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**, 170-173.
- [4] Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. und Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7415-7419.
- [5] Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Charnaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. und Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
- [6] 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., White, G., Foster, P. und Markham, P.D. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503.
- [7] Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., und Oshiro, L.S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**, 840-842.
- [8] Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211.
- [9] Temin, H. und Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-1213.
- [10] Stryer, L. (1994). Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, neubearbeitete Auflage, 11, 909.
- [11] Schulz, T.F., Jameson, B.A., Lopalco, L., Siccardi, A.G., Weiss, R.A. und Moore, J.P. (1992). Conserved structural features in the interaction between retroviral surface and transmembrane glycoproteins?. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**, 1571-1580.
- [12] modifiziert nach: Fields, B.N., Knipe, D.M. und Howley, P.M. (1995). Virology. *Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (USA)*, third edition, 1886.

- [13] Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDouglas, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A. und Axel, R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**, 333-348.
- [14] McDouglas, J.J., Kennedy, M.S., Sligh, J.M., Cort, S.P., Mawle, A. und Nicholson, J.K. (1986). Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* **231**, 382-385.
- [15] Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y.X., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P. und Paxton, W.A. HIV-1 entry into CD4(+) cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673.
- [16] Deng, H.K., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Dimarzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R. und Landau, N.R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666.
- [17] Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M. und Berger, E.A. (1996). CC CKRS - A RANTES, MIP-1- α , MIP-1- β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958.
- [18] Lapham, C.K., Ouyang, J., Chandrasekhar, B., Nguyen, N.Y., Dimitrov, D.S. und Golding, H. (1996). Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* **274**, 602-605.
- [19] Di Marzo Veronese, F., Copeland, T.D., De Vico, A.L., Rahman, R., Oroszlan, S., Gallo, R.C. und Sarngadharan, M.G. (1986). Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* **231**, 1289-1291.
- [20] Bukrinsky, M., Sharova, N. und Stevenson, M. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 2-LTR circles reside in a nucleoprotein complex which is different from the preintegration complex. *J. Virol.* **67**, 6863-6865.
- [21] Pomerantz, R.J., Trono, D., Feinberg, M.B. und Baltimore, D. (1990). Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. *Cell* **61**, 1271-1276.
- [22] modifiziert nach: Meyerhans, A. (1994). *Futura* **2**, 82-90.
- [23] modifiziert nach: Stryer, L. (1994). Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, neubearbeitete Auflage, 911.
- [24] Lowe, D.M., Aitken, A., Bradley, C., Darby, G.K., Larder, B.A., Powell, K.L., Rurifoy, D.J.M., Tisdale, M. und Stammers, D.K. (1988). HIV-1 reverse transcriptase: crystallization and analysis of domain structure by limited proteolysis. *Biochemistry* **27**, 8884-8889.

- [25] Restle, T., Müller, B. und Goody, R.S., (1990). Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. A target for chemotherapeutic intervention. *J. Biol. Chem.* **265**, 8986-8988.
- [26] Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D.J., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kramer, G., Ferris, A.L., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S.H. und Arnold, E. (1993). Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6320-6324.
- [27] Rodgers, D.W., Gamblin, S.J., Harris, B.A., Ray, S., Culp, J.S., Hellmig, B., Woolf, D.J., Debouck, C. und Harrison, S.C. (1995). The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1222-1226.
- [28] Hsiou, Y., Ding, J., Das, K., Clark, A.J., Hughes, S. und Arnold, E. (1996). Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure* **4**, 853-860.
- [29] Jäger, J., Restle, T. und Steitz, T.A. (1998). The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an RNA pseudoknot inhibitor. *EMBO J.* **17**, 4535-4542.
- [30] Das, K., Ding, J., Hsiou, Y., Clark Junior, A.D., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Pauwels, R., Janssen, P.A., Boyer, P.L., Clark, P., Smith Junior, R.H., Kroeger Smith, M.B., Michejda, C.J., Hughes, S.H. und Arnold, E. (1996). Crystal structures of 8-Cl and 9-Cl TIBO complexed with wild-type HIV-1 RT and 8-Cl TIBO complexed with the Tyr181Cys HIV-1 RT drug-resistant mutant. *J. Mol. Biol.* **264**, 1085-1100.
- [31] Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A. und Steitz, T.A. (1993). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**, 1783-1790.
- [32] Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., Somers, D., Ross, C., Kirby, C.R.I., Keeling, J., Darby, G., Jones, Y., Stuart, D.I. und Stammers, D. (1995). High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nature Struct. Biol.* **2**, 293-302.
- [33] Wöhrle, B.M., Krebs, R., Goody, R.S. und Restle, T. (1999). Refined model for primer/template binding by HIV-1 reverse transcriptase: Pre-steady-state kinetic analyses of primer/template binding and nucleotide incorporation events distinguish between different binding modes depending on the nature of the nucleic acid substrate. *J. Mol. Biol.* **292**, 333-344.
- [34] Hubbell, W.L., McHaourab, H.S., Altenbach, C. und Lietzow, M.A. (1996). Watching proteins move using site-directed spin labeling. *Structure* **4**, 779-783.

- [35] Hubbell, W.L., Gross, A., Langen, R. und Lietzow, M.A. (1998). Recent advances in site-directed spin labeling of proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 649-656.
- [36] Hubbell, W.L., und Altenbach, C. (1994). Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 566-573.
- [37] Steinhoff, H.J., Radzwill, N., Thevis, W., Lenz, V., Brandenburg, D., Antson, A., Dodson, G. und Wollmer, A. (1997). Determination of interspin distances between spin labels attached to insulin: comparison of electron paramagnetic resonance data with the X-ray structure. *Biophys. J.* **73**, 3287-3298.
- [38] Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L. und Khorana, H.G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **274**, 768-770.
- [39] Thorgeirsson, T.E., Xiao, W.Z., Brown, L.S., Needleman, R., Lanyi, J.K. und Shin, Y.K. (1997). Transient channel-opening in bacteriorhodopsin - an epr study. *J. Mol. Biol.* **273**, 951-957.
- [40] Tiebel, B., Radzwill, N., Aung-Hilbrich, L.M., Helbl, V., Steinhoff, H.J. und Hillen, W. (1999). Domain motions accompanying Tet repressor induction defined by changes of interspin distances at selectively labelled sites. *J. Mol. Biol.* **290**, 229-240.
- [41] Nie, S., Chiu, D.T. und Zare, R.N. (1994). Probing Individual Molecules with Confocal Fluorescence Microscopy. *Science* **266**, 1018-1021.
- [42] Xie, X.S. und Trautman, J.K. (1998). Optical studies of single molecules at room temperature. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49**, 441-480.
- [43] Sauer, M., Arden-Jacob, J., Drexhage, K.H., Göbel, F., Lieberwirth, U., Mühlegger, K., Müller, R., Wolfrum, J. und Zander, C. (1998). Time-Resolved identification of individual mononucleotide molecules in aqueous solution with pulsed semiconductor lasers. *Bioimaging* **6**, 14-24.
- [44] Eggeling, C., Fries, J.R., Brand, L., Gunther, R. & Seidel, C.A.M. (1998). Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1556-1561.
- [45] Certa, U., Bannwarth, W., Stüber, D., Gentz, R., Lanzer, M., Le Grise, S., Guillot, F., Wendler, I., Hunsmann, G., Bujard, H. und Mous, J. (1986). Subregions of a conserved part of the HIV gp41 transmembrane protein are differentially recognized by antibodies of infected individuals. *EMBO J.* **5**, 3051-3056.
- [46] Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. und Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.

- [47] Herlitzte, S. und Koenen, M. (1990). A general and rapid mutagenesis method using the polymerase chain reaction. *Gene* **91**, 143-147.
- [48] Müller, B., Restle, T., Weiss, S., Gautel, M., Sczakiel, G. und Goody, R.S. (1989). Co-expression of the subunits of the heterodimer of HIV-1 reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 13975-13978.
- [49] Le Grice, S.F., Naas, T., Wohlgensinger, B. und Schatz, O. (1991). Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J.* **10**, 3905-3911.
- [50] Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- [51] Fries, J. R. (1998). Charakterisierung einzelner Moleküle in Lösung mit Rhodamin-Farbstoffen. Dissertation, *Universität-Gesamthochschule Siegen*.
- [52] Modifiziert nach: Winter, R. und Noll, F. (1998). Methoden der Biophysikalischen Chemie. *Teubner*.
- [53] Altenbach, C., Flitsch, S., Khorana, H. und W. Hubbell. (1989). Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines. *Biochemistry* **28**, 7806-7812.
- [54] Steinhoff, H.J., Lieutenant, K., und Schlitter J. (1989). Residual motion of hemoglobin-bound spin labels as a probe for protein dynamics. *Z. Naturforsch.* **44c**, 280-288.
- [55] Libertini, L.J., und Griffith, O.H. (1970). Orientation dependence of the electron resonance spectrum of di-*t*-butyl nitroxide. *J. Chem.Phys.* **53**, 1359-1367.
- [56] Steinhoff, H.J. (1988). A simple method for determination of rotational correlation times and separation of rotational and polarity effects from EPR spectra of spin-labeled biomolecules in a wide correlation time range. *Biochem. Biophys. Methods* **17**, 237-248.
- [57] Steinhoff, H.J., Müller, M., Beier, C. und Pfeiffer, M. (2000). Molecular dynamics simulation and EPR spectroscopy of nitroxide side chains in bacteriorhodopsin. *J. Molecular Liquids* **84**, 17-27.
- [58] Keller, R.A., Ambrose, W.P., Goodwin, P.M., Jett, J.H., Martin, J.C. und Wu, M. (1996). Single-molecule fluorescence analysis in solution. *Appl. Spectrosc.* **50**, 12A-32A.
- [59] Brand, L. (1998). Zeitaufgelöster Nachweis einzelner Moleküle in Lösung. Dissertation, *Georg-August-Universität Göttingen*.
- [60] Zander, C., Sauer, M., Drexhage, K.H., Ko, D.S., Schulz, A., Wolfrum, J., Brand, L., Eggeling, C. und Seidel, C.A.M. (1996). Detection and characterization of single molecules in aqueous solution. *Appl. Phys. B* **63**, 517-523.

- [61] Brand, L., Eggeling, C., Zander, C., Drexhage, K.H. und Seidel, C.A.M. (1997). Single-molecule identification of coumarin-120 by time-resolved fluorescence detection - comparison of one- and two-photon excitation in solution. *J. Phys. Chem. A* **101**, 4313-4321.
- [62] Fries, J.R., Brand, L., Eggeling, C., Köllner, M. und Seidel, C.A.M. (1998b). Quantitative identification of different single-molecules by selective time-resolved confocal fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **102**, 6601-6613.
- [63] Schaffer, J., Volkmer, A., Eggeling, C., Subramaniam, V., Striker, G. und Seidel, C.A.M. (1999). Identification of single molecules in aqueous solution by time-resolved fluorescence anisotropy. *J. Phys. Chem. A* **103**, 331-336.
- [64] Eggeling, C., Fries, J.R., Brand, L., Günther, R., Seidel, C.A.M. (1998). Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1556-1561.
- [65] Eggeling, C. (2000). Analyse von photochemischer Kinetik und Moleküldynamik durch mehrdimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie. Dissertation, *Georg-August-Universität Göttingen*.
- [66] Köllner, M. und Wolfrum, J. (1992). How many photons are necessary for fluorescence-lifetime measurements?. *Chem. Phys. Lett.* **200**, 199-204.
- [67] Köllner, M. (1993). How to find the sensitivity limit for DNA sequencing based on laser-induced fluorescence. *Appl. Opt.* **32**, 806-820.
- [68] Köllner, M., Fischer, A., Arden-Jacob, J., Drexhage, K.H., Müller, R., Seeger, S. und Wolfrum, J. (1996). Fluorescence pattern recognition for ultrasensitive molecule identification: comparison of experimental data and theoretical approximations. *Chem. Phys. Lett.* **250**, 355-360.
- [69] Kotze, T.J.v.W. und Gokhale, D.V. (1980). A Comparison of the Pearson- χ^2 and Log-Likelihood-Ratio Statistics for Small Samples by Means of Probability Order. *J. Statist. Comput. Simul.* **12**, 1-13.
- [70] Hall, P. und Selinger, B. (1981). Better Estimates of Exponential Decay Parameters. *J. Phys. Chem.* **85**, 2941-2946.
- [71] Enderlein, J., Robbins, D.L., Ambrose, W.P., Goodwin, P.M. und Keller, R.A. (1997). The statistics of single molecule detection: an overview. *Bioimaging* **5**, 88-98.
- [72] persönliche Mitteilung, Sylvia Berger.
- [73] Weiss, S. (1988). Klonierung, Expression und biochemische Charakterisierung der HIV-1 Reversen Transkriptase. Diplomarbeit, *Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*.

- [74] persönliche Mitteilung, Stuart Le Grice.
- [75] Hahn, B.H., Gonda, M.A., Shaw, G.M., Popovic, M., Hoxie, J.A., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F. (1985). Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4813-4817.
- [76] Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A. und Baumeister, K. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**, 277-284.
- [77] Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. und Harrison, S. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: Implications for drug resistance. *Science* **282**, 1669-1675.
- [78] Mchaourab, H.S., Oh, K.J., Fang, C.J. und Hubbell, W.L. (1997). Conformation of T4 lysozyme in solution - hinge-bending motion and the substrate-induced conformational transition studied by site-directed spin labeling. *Biochemistry* **36**, 307-316.
- [79] Pfeiffer, M., Rink, T., Gerwert, K., Oesterhelt, D. und Steinhoff, H.J. (1999). Site-directed spin-labeling reveals the orientation of the amino acid side-chains in the E-F loop of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **287**, 163-171.
- [80] Steinhoff, H.J., Dombrowsky, O., Karim, C. und Schneiderhahn, C. (1991). Two dimensional diffusion of small molecules on protein surfaces: an EPR study of the restricted translational diffusion of protein-bound spin labels. *EUR. Biophys. J.* **20**, 293-303.
- [81] Merluzzi, V.J., Hargrave, K.D., Labadia, M., Grozinger, K., Skoog, M., Wu, J.C., Shih, C.K., Eckner, K., Hattox, S. und Adams, J. (1990). Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science* **250**, 1411-1413.
- [82] Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Schols, D., Kukla, M.J., Breslin, H.J., Raeymaeckers, A., Van Gelder, J., Woestenborghs, R. und Heykants, J. (1990). Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives. *Nature* **343**, 470-474.
- [83] Esnouf, R., Ren, J., Ross, R., Jones, Y., Stammers, D. und Stuart, D. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non nucleoside inhibitors. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 303-308.
- [84] Tuerk, C., MacDougal, S. und Gold, L. (1992). RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6988-6992.

- [85] Kensch, O., Connolly, B.A, Steinhoff, H.J., McGregor, A., Goody R.S. und Restle, T. (2000). HIV-1 reverse transcriptase/pseudoknot-RNA aptamer interaction has a binding affinity in the low picomolar range coupled with high specificity. *J. Biol. Chem.* **275**, 18271-18278.
- [86] Jacobo-Molina, A., Clark, A.D.J., Williams, R.L., Nanni, R.G., Clark, P., Ferris, A.L., Hughes, S.H. und Arnold, E. (1991). Crystals of a ternary complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a monoclonal antibody Fab fragment and double-stranded DNA diffract x-rays to 3.5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10895-10899.
- [87] Stryer, L. (1994). Biochemie, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, neubearbeitete Auflage, 683.

6 Anhang

6.1 Oligodesoxyribonukleotide (Sequenz: 5' → 3')

Flo1	TCCCTGTTCGGGCGCCAC
Flo4	TGTGGAAAATCTCTAGATGTGGCGCCCGAACAGGGA
C280Santi	TTCTCTAAGGAGTTTAGATAATTGCCTTACTTTA
C280Ssense	TAAAGTAAGGCAATTATCTAAACTCCTTAGAGGAA
QX66anti	ATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGC
S68Csense	TTGCCATAAAGAAAAAAGACTGTACTAAATGGAGA
2HMI36Cy5_3'	AGGGACAAGCCCGCAGCATGGCGCCCGAACAGGGACXph
PBS-Cy5	*TTGTCCCTGTTCGGGCGCC
PBSDNA	GGGTTAATCTCTGCATGGCGCCCGAACAGGGACAA

ph = 3'-Phosphat

X = Cy5

* = 5'-Ende mit Cy5 markiert

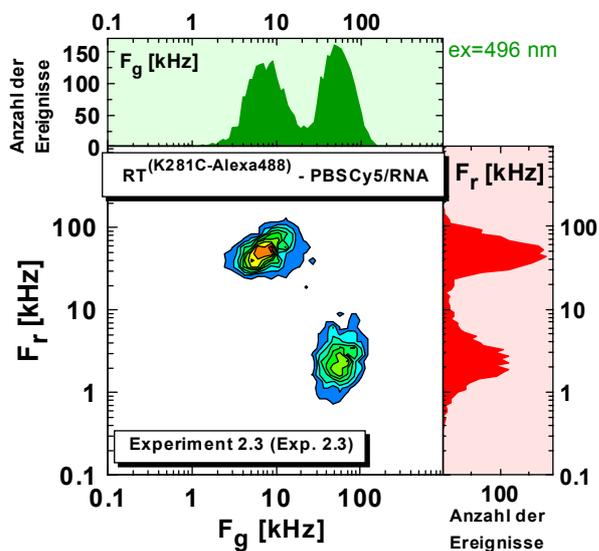
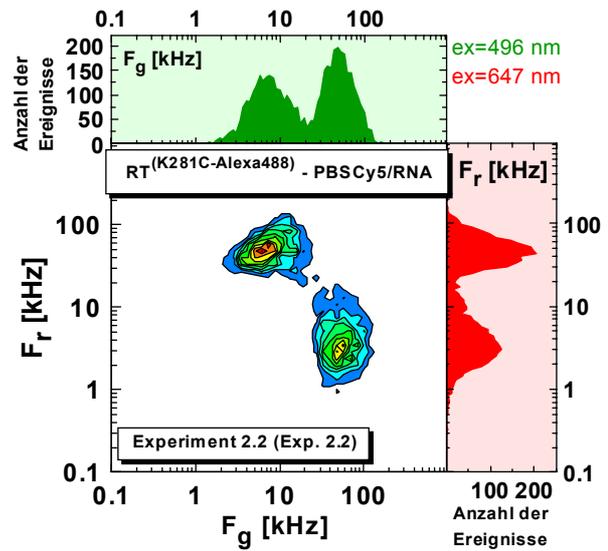
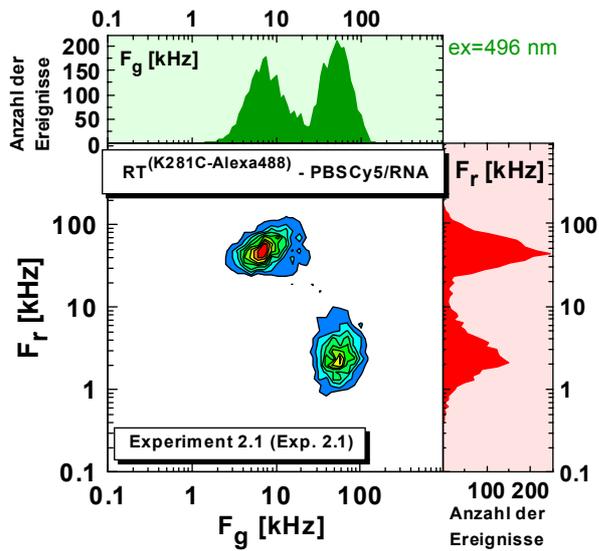
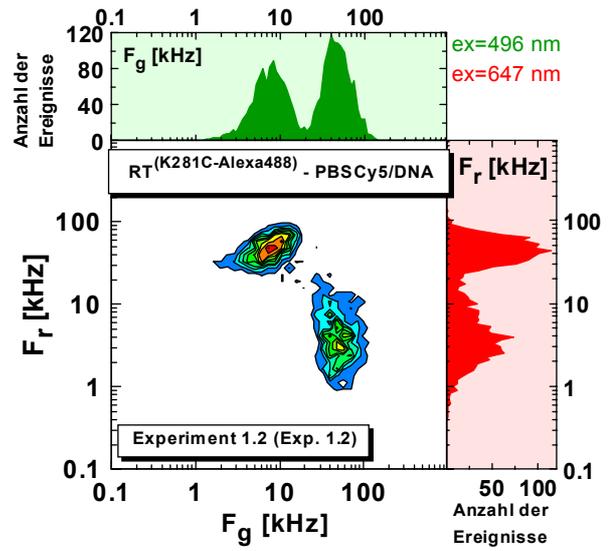
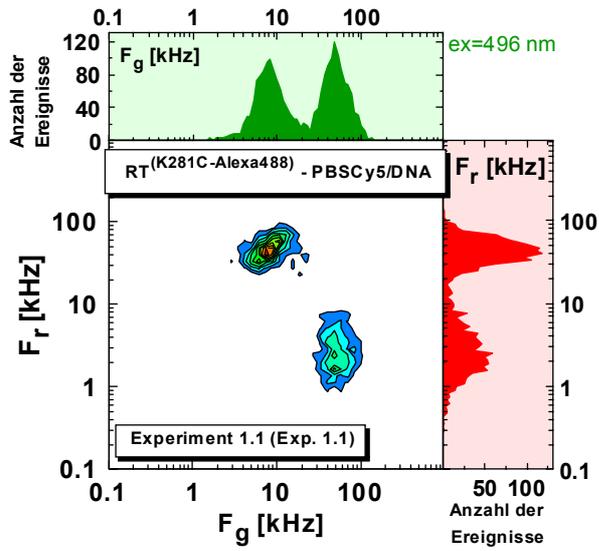
6.2 Oligoribonukleotid (Sequenz: 5' → 3')

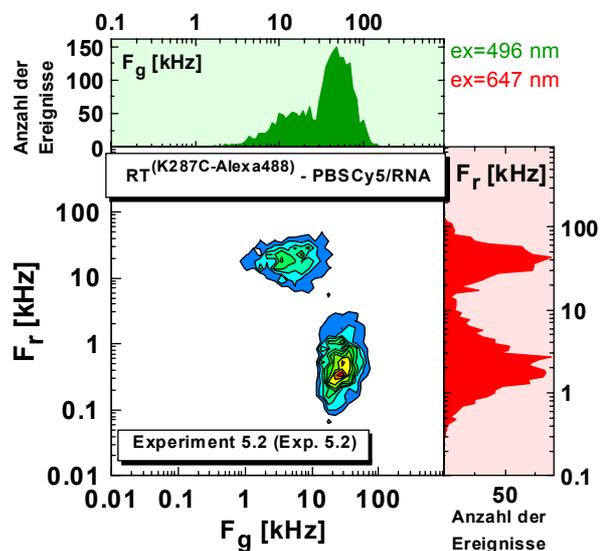
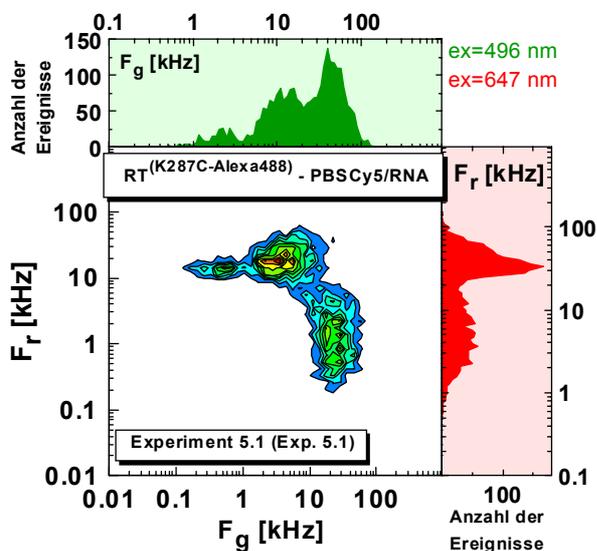
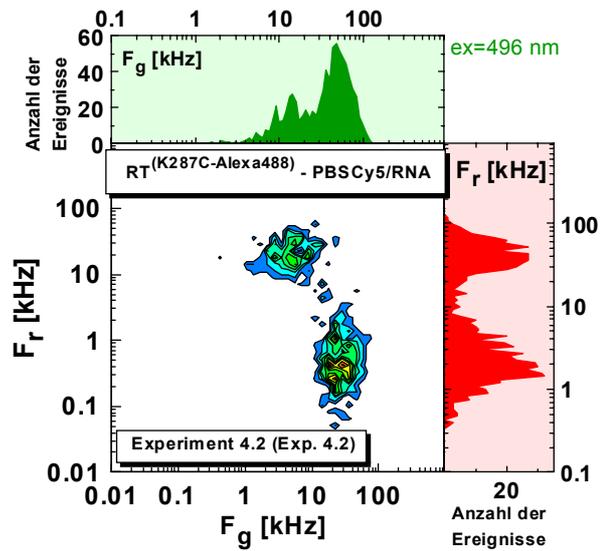
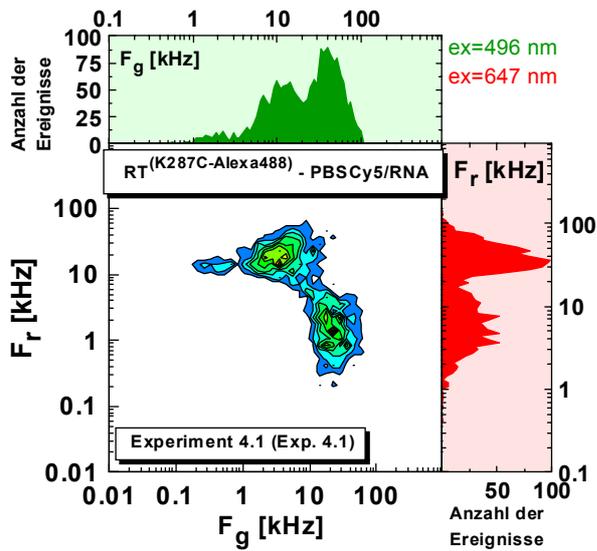
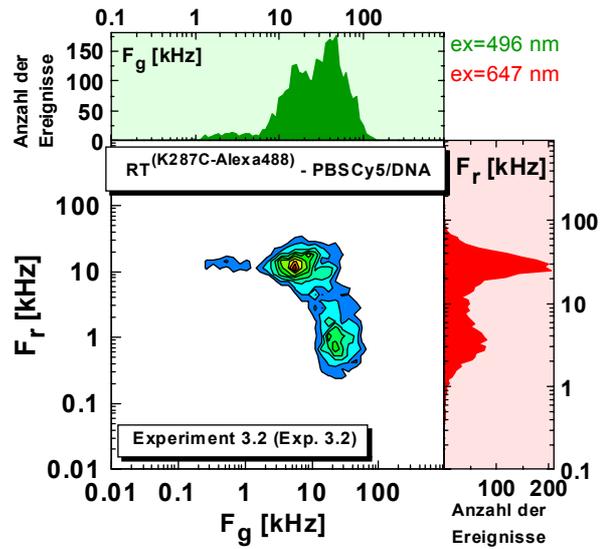
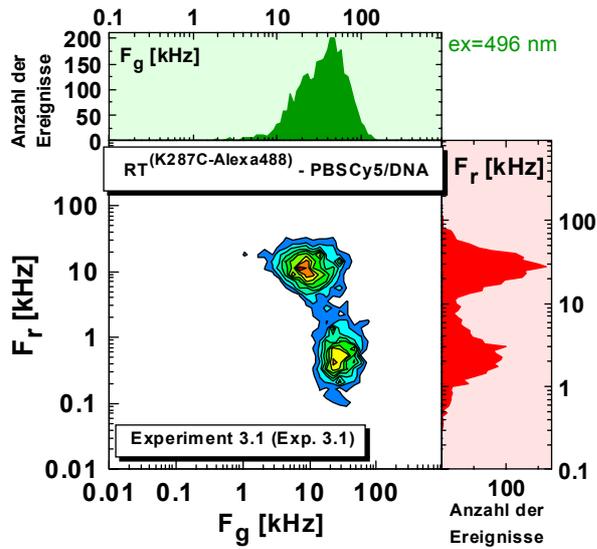
PBSRNA	GGGTTAATCTCTGCATGGCGCCCGAACAGGGACAA
--------	-------------------------------------

6.3 2D-Diagramme der Einzelmolekül-Experimente

Im Folgenden sind die 2D-Diagramme zu den zeitaufgelösten Experimenten aus 3.7.2 sowie die Einzel-Messungen für die in 3.7.2 dargestellten 2D-Diagramme der summierten Messungen dargestellt

6.3.1 2D-Diagramme zu den zeitaufgelösten Experimenten (Tabellen 3.7.2.4-2 - 3.7.2.4-6)

6.3.1.1 Experimente mit RT^(K281-Alexa488)

6.3.1.2 Experimente mit RT^(K287-Alexa488)

6.3.2 2D-Diagramme der Einzel-Messungen (Abbildung 3.7.2.1-1 - Abbildung 3.7.2.3-2)

Abbildung 3.7.2.1-1

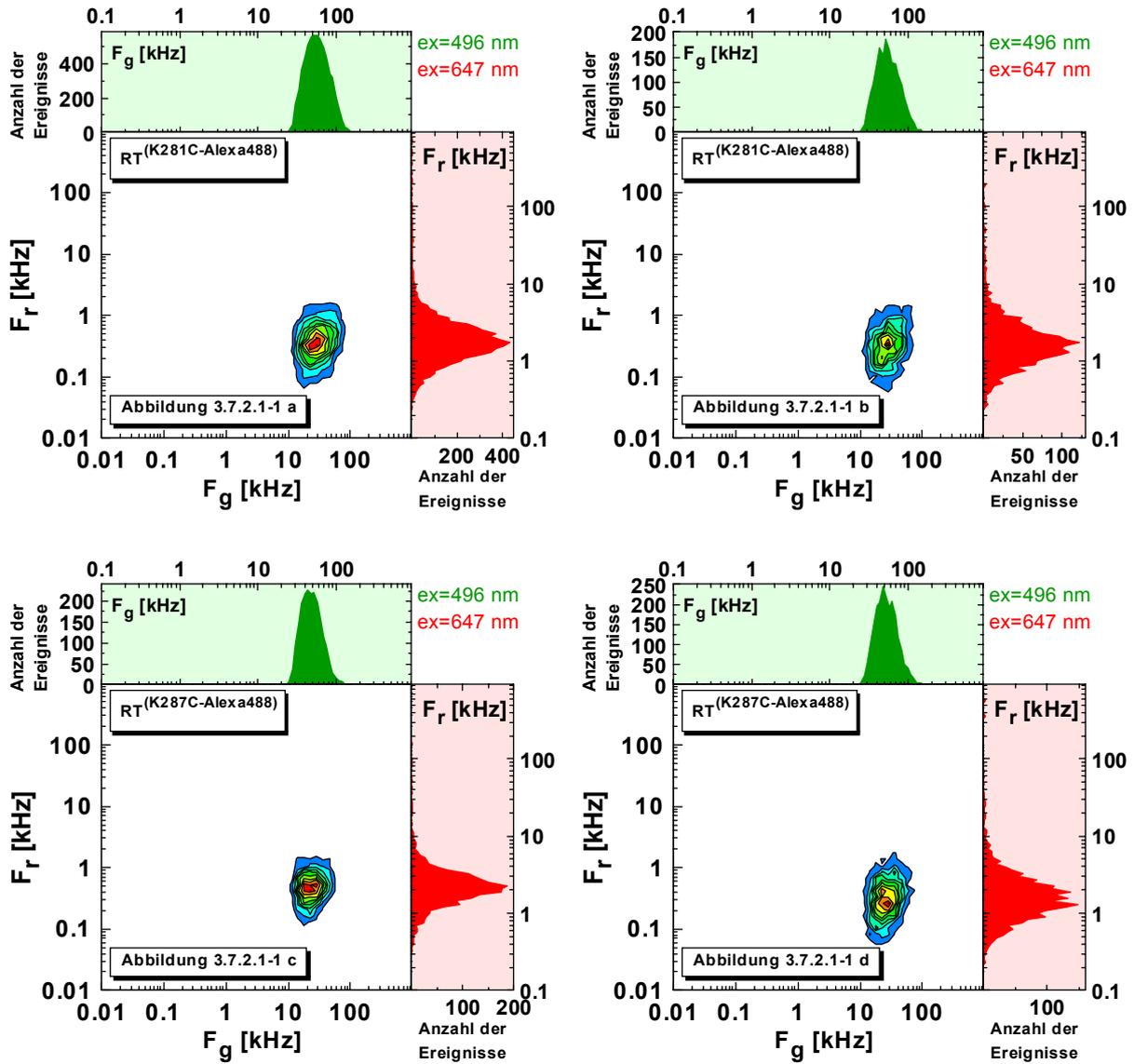


Abbildung 3.7.2.2-1

Die 2D-Diagramme der Abbildung 3.7.2.2-1 setzen sich aus den 2D-Diagrammen der Einzelmessungen Exp.1.1, Exp.1.2 (vgl. 6.3.1) und den folgenden 2D-Diagrammen zusammen.

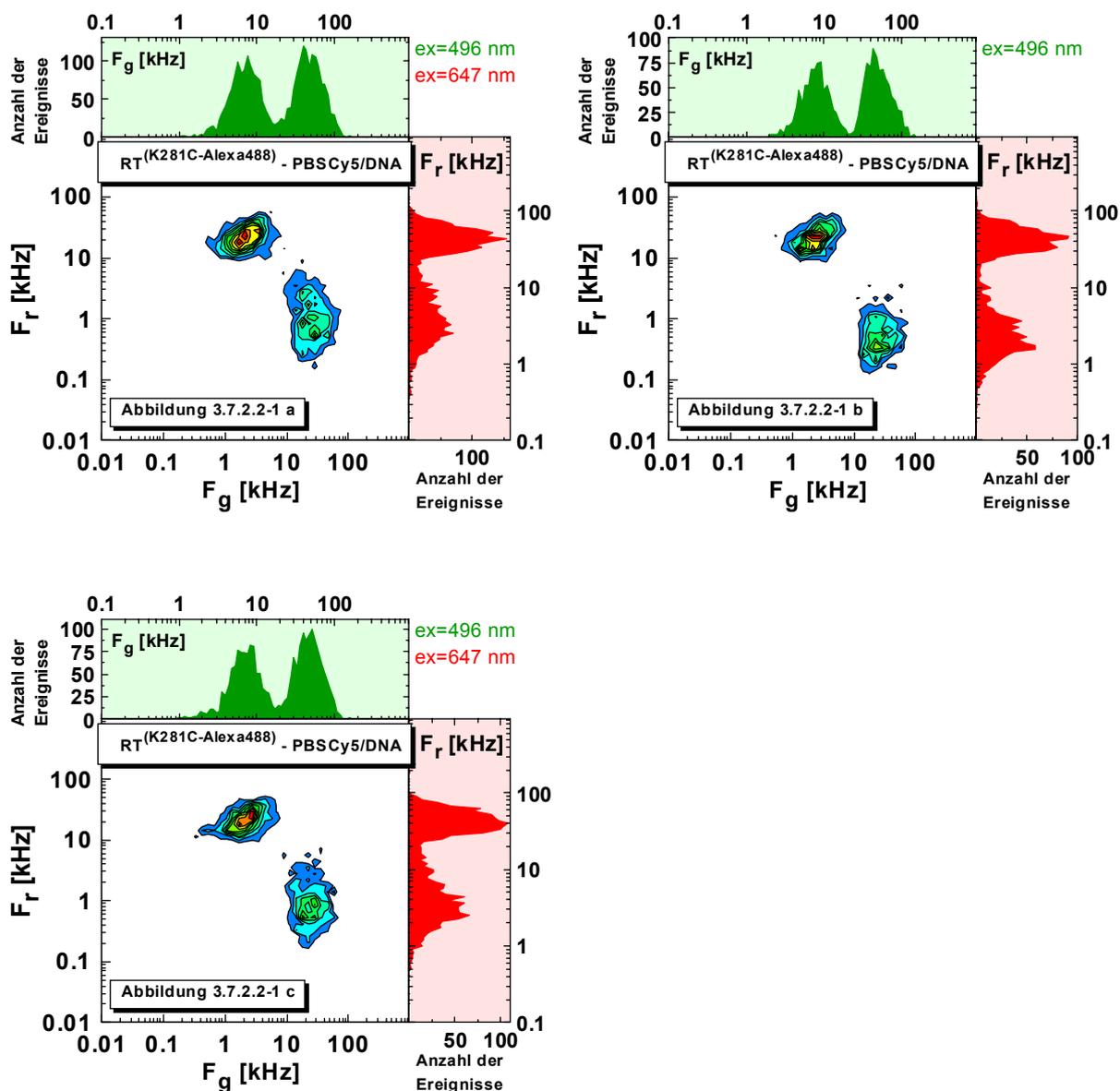


Abbildung 3.7.2.2-2

Die 2D-Diagramme der Abbildung 3.7.2.2-2 setzen sich aus den 2D-Diagrammen der Einzelmessungen Exp.2.1, Exp.2.2, Exp.2.3 (vgl. 6.3.1) und dem folgenden 2D-Diagramm zusammen.

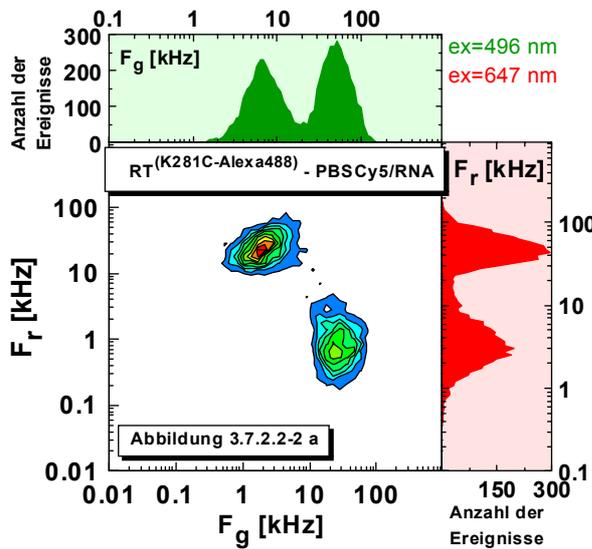


Abbildung 3.7.2.3-1

Die 2D-Diagramme der Abbildung 3.7.2.2-2 setzen sich aus den 2D-Diagrammen der Einzelmessungen Exp.3.1, Exp.3.2, (vgl. 6.3.1) und den folgenden 2D-Diagrammen zusammen.

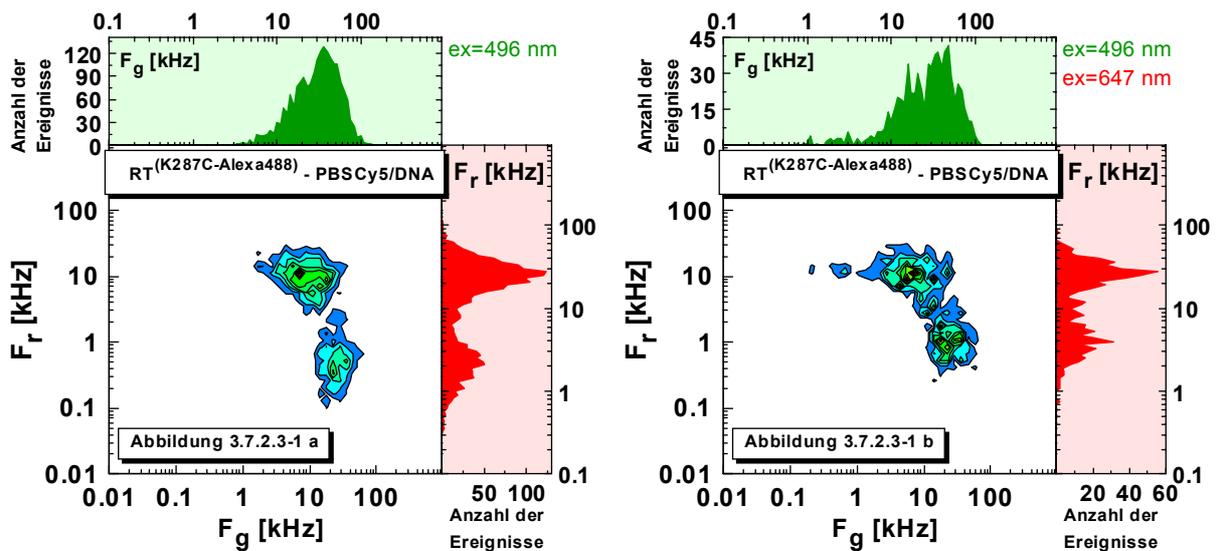
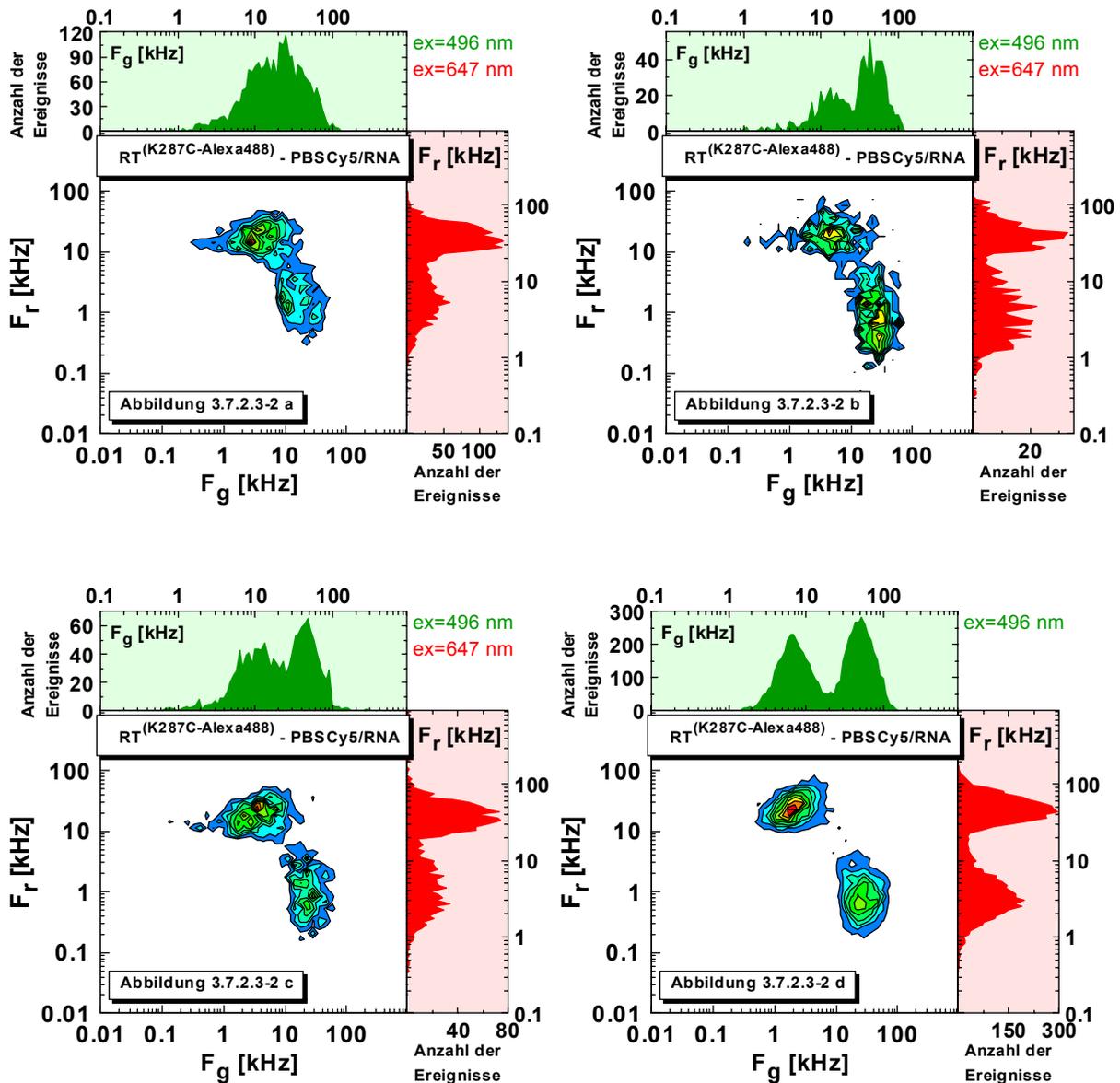


Abbildung 3.7.2.3-2

Die 2D-Diagramme der Abbildung 3.7.2.2-2 setzen sich aus den 2D-Diagrammen der Einzelmessungen Exp.4.1, Exp.4.2, Exp.5.1, Exp.5.2 (vgl. 6.3.1) und den folgenden 2D-Diagrammen zusammen.



Eigene Veröffentlichungen

Kensch, O., Connolly, B.A., Steinhoff, H.J., McGregor, A., Goody, R.S. und Restle, T. (2000). HIV-1 reverse transcriptase-pseudoknot rna aptamer interaction has a binding affinity in the low picomolar range coupled with high specificity. *J. Biol. Chem.* **275**,18271–18278.

Kensch, O., Restle, T., Wöhrl, B.M., Goody, R.S. und Steinhoff, H.J. (2000). Temperature dependent equilibrium between the open and closed conformation of the p66 subunit of HIV-1 reverse transcriptase revealed by site-directed spin labelling. *J. Mol. Biol.* (in Druck).

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Kensch
Vorname: Oliver
Geburtstag und -ort: 09.04.1970 in Unna
Familienstand : ledig

Schulbildung

Aug. 1976 - Juni 1980 Grundschole Holzwickede
Aug. 1980 - Mai 1990 Pestalozzi-Gymnasium Unna
Abschluß Abitur

Bundeswehr

Juli 1990 - Juni 1991 Grundwehrdienst beim Panzerbataillon 33 in Neustadt am
Rübenberge

Studium

Okt. 1991 - Okt. 1993 Grundstudium an der Universität Dortmund, FB Chemie
Okt. 1993 - Feb. 1996 Hauptstudium an der Universität Dortmund, FB Chemie
März 1996 - Sept. 1996 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie,
Dortmund: Markierungsversuche an der Mutante p66^{C280S}/
p51^{C38V/C280S} der Reversen Transkriptase von HIV-1
5. Sept. 1996 Diplomvergabe (Note: 1,6)
Nov. 1996 – Aug. 2000 Dissertation am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in
der Abteilung für Physikalische Biochemie (Prof. Dr. R. S. Goody):
Untersuchungen zur Konformation und Dynamik der Reversen
Transkriptase von HIV-1 durch ESR- und inzelmolekülfluoreszenz-
spektroskopie
seit Okt. 1997 Wirtschaftswissenschaftlicher Zusatzstudiengang für Ingenieure und
Naturwissenschaftler, FernUniversität Gesamthochschule Hagen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Roger S. Goody für die interessante Themenstellung und die großen wissenschaftlichen Freiräume, die ich während der Zeit am MPI Dortmund genießen durfte.

Professor Dr. B. Lippert danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Korreferats.

Birgitta Wöhrl und Tobias Restle möchte ich für ihre freundschaftliche Betreuung und unendliche Diskussionsbereitschaft danken.

Susanne Werner, Paul Rothwell, Martina Wischnewski und Karin Vogel-Bachmayr danke ich für viele gemeinsame Stunden im Labor und ihre tatkräftige und moralische Unterstützung.

Bei Paul Rothwell möchte ich mich für die intensive Zusammenarbeit an den Einzelmolekül-experimenten und besonders für die tagelange Schichtarbeit am MPI Göttingen bedanken. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Claus Seidel, Sylvia Berger, Jörg Schaffer, Enno Schweinberger, Suren Felekyan, Matthew Antonik, Carl Sandhagen und Christian Eggeling am MPI Göttingen für die Ermöglichung der Einzelmoleküluntersuchungen und die freundschaftliche Kooperation danken.

Für die angenehme und fruchtbare Kooperation in den ESR-Untersuchungen an der Ruhr-Uni Bochum gilt mein herzlichster Dank Heinz-Jürgen Steinhoff. Für die gute Atmosphäre in der ESR-Gruppe danke ich auch Nicole Radzwill, Christoph Wegener, Christian Beier und Martin Kühn. Christian Beier danke ich speziell für die MD Simulationen.

Allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts danke ich für die außergewöhnlich freundschaftliche Atmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben und meiner Freundin Kristiane Borchers für ihre Anteilnahme an den Freuden und Leiden der Arbeit und ihrer Rücksichtnahme und Unterstützung in schwierigen Zeiten.