

Entwicklung antiviraler Strategien am Beispiel der HIV-1 Reversen Transkriptase

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dina Grohmann
aus Stollberg

Düsseldorf
2006

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Detlef Riesner

Koreferent: Prof. Dr. Roger S. Goody

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	HIV	1
1.1.1	Aufbau von HIV-1	2
1.1.1.1	Viruspartikel	2
1.1.1.2	Genomaufbau	2
1.1.2	Replikationszyklus	4
1.1.3	Die reverse Transkription	6
1.2	Reverse Transkriptase	8
1.2.1	Struktur	8
1.2.2	Substratbindung und Nukleotid-Inkorporation durch die Reverse Transkriptase	10
1.3	Nucleocapsid-Protein (NC)	12
1.4	Therapie und Resistenz	15
1.5	Zielstellung	18
2	Material	19
2.1	Allgemeines	19
2.2	Verbrauchsmaterial	19
2.3	Säulen und Säulenmaterial	20
2.4	Geräte	20
2.5	Bakterienstämme	21
2.6	Plasmide	22
2.7	Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien	22
2.8	Enzyme und Größenstandards	23
2.9	Oligonukleotide	23
2.9.1	DNA-Oligonukleotide	23
2.9.2	RNA-Oligonukleotide	24
2.10	Peptide	25
2.11	Proteine	26
2.12	Radioaktiv markierte Nukleotide	26

3 Methoden	27
3.1 Molekularbiologische Methoden	27
3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
3.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion	27
3.1.3 Fällung von Nukleinsäuren	28
3.1.3.1 Natriumacetat/Ethanol-Fällung	28
3.1.3.2 Isopropanol-Fällung	28
3.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten	28
3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
3.1.6 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	29
3.1.7 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation von Plas- mid-DNA	29
3.1.8 Isolation von Plasmid-DNA	29
3.1.9 Glyzerinkulturen von Bakterien	30
3.2 Proteinbiochemische Methoden	30
3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	30
3.2.1.1 Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung .	30
3.2.1.2 Konzentrationsbestimmung nach Ehresmann	30
3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford	30
3.2.2 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen	31
3.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
3.2.4 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen	32
3.2.5 Expression von Proteinen	32
3.2.6 Reinigung der HIV-1 Reversen Transkriptase	33
3.2.6.1 Puffer	33
3.2.6.2 Zellaufschluss	34
3.2.6.3 Erste Ammoniumsulfatfällung	34
3.2.6.4 Nukleinsäure-Fällung	34
3.2.6.5 DEAE-Säule	34
3.2.6.6 Heparin-Säule	35
3.2.6.7 Zweite Ammoniumsulfatfällung	35
3.2.6.8 Gelfiltration	35
3.2.7 Reinigung der p51 Untereinheit der HIV-1 Reversen Transkriptase	35
3.2.7.1 Puffer	35
3.2.7.2 Zellaufschluss	36
3.2.7.3 Ni-NTA-Säule	36
3.2.7.4 DEAE / Hi-Trap SP Säule	36

3.2.8	Reinigung der <i>firefly</i> Luziferase	37
3.2.8.1	Puffer	37
3.2.8.2	Zellaufschluss	37
3.2.8.3	Glutathion-Säule	38
3.2.8.4	Ionenaustauschersäule	38
3.2.8.5	Gelfiltration	38
3.2.9	Lösen des Nucleocapsid-Proteins	38
3.2.10	Test auf RNase-Kontamination	39
3.3	Nukleinsäuren	39
3.3.1	Transkription	39
3.3.2	Radioaktive 5'-Endmarkierung von Nukleinsäuren	40
3.3.3	Hybridisierung von Oligonukleotiden	41
3.3.4	Gelelektrophorese	41
3.3.4.1	Analytische native Gelelektrophorese	42
3.3.4.2	Analytische denaturierende Gelelektrophorese	42
3.3.4.3	Präparative denaturierende Gelelektrophorese	43
3.3.4.4	Reinigung von Nukleinsäuren durch Gelelution	43
3.3.4.5	Elektrotransfer von Nukleinsäuren	43
3.4	Enzymkinetische Methoden	44
3.4.1	Untersuchungen zur Dimerisierung der Reversen Transkriptase	44
3.4.1.1	HPLC-Gelfiltration	44
3.4.1.2	Assoziation der Reversen Transkriptase Untereinheiten	44
3.4.1.3	Reassoziaton der Reversen Transkriptase Untereinheiten	45
3.4.2	Filterbindungsassay	45
3.4.3	Standard-Polymeraseassay	46
3.4.4	RNaseH-Assay	47
3.4.5	Charakterisierung des Nukleotideinbaus durch die Reverse Transkriptase	48
3.4.5.1	Untersuchung sehr schneller Einbaukinetiken	48
3.4.5.2	Untersuchung langsamer Einbaukinetiken	50
3.4.6	Fluoreszenzspektroskopische Methoden	50
3.4.6.1	Gleichgewichts-Fluoreszenzmessungen	50
3.4.6.2	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Messungen	51
3.4.6.3	Test auf Chaperonaktivität des Nucleocapsid-Proteins	52
3.4.7	Bestimmung der Luziferaseaktivität	53
3.4.8	Bestimmung der ATPase-Aktivität	53

4	Ergebnisse	55
4.1	Proteinaufreinigung	55
4.1.1	Präparation der HIV-1 Reversen Transkriptase	55
4.1.2	Präparation der p51 Untereinheit der Reversen Transkriptase	57
4.1.3	Expression und Aufreinigung der <i>firefly</i> Luziferase	59
4.1.3.1	Klonierung und Expression	59
4.1.3.2	Präparation und Charakterisierung der rekombinanten Luziferase	61
4.2	Inhibition der Dimerisierung der Reversen Transkriptase	63
4.2.1	Charakterisierung des Dimerisierungsprozesses über Mutations- studien in der p51 UE	64
4.2.2	Niedermolekulare Moleküle als Dimerisierungsinhibitoren	66
4.2.2.1	Computergestützter Ansatz zur Selektion niedermoleku- larer Dimerisierungsinhibitoren	67
4.2.2.2	Charakterisierung der verminderten Reassoziaton in An- wesenheit von MAS 0 und MAS 1	69
4.2.2.3	Einfluss von MAS 0 und MAS 1 auf die Polymeraseaktivität	71
4.2.2.4	Spezifität der Inhibition der Polymeraseaktivität durch MAS 0	73
4.2.3	Inhibition der Dimerisierung durch Nukleinsäuren	74
4.2.3.1	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Selektion	75
4.2.3.2	Bindungs- und Inhibitionsstudien für die ausgewählten Aptamere	75
4.2.4	Inhibition der Dimerisierung durch Peptide	78
4.2.4.1	Mutation der Kontaktstellen des Dimerisierungsinhibi- tors p7	78
4.2.4.2	Peptide abgeleitet von der Verbindungsdomäne	80
4.2.4.3	Von der RNaseH-Domäne der RT abgeleitete Peptide	82
4.3	Nukleinsäureinhibitoren	83
4.3.1	Bindungseigenschaften ausgewählter Nukleinsäureinhibitoren	84
4.3.2	Charakterisierung der Inhibition der enzymatischen Aktivitäten der RT durch Nukleinsäuren	87
4.3.3	Wechselwirkung von Nukleinsäureinhibitoren mit NRTI-resisten- ten RT-Mutanten	89
4.4	Einfluss des Nucleocapsid-Proteins auf den RT-vermittelten Polymerisa- tionsprozess	93
4.4.1	Ausgangssituation	93

4.4.2	Charakterisierung der Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen . . .	93
4.4.2.1	Wahl der Substrate	93
4.4.2.2	Chaperonaktivität des NC-Proteins	95
4.4.2.3	Affinität der RT und des NC-Proteins zu den Substraten	96
4.4.3	Einzelnukleotideinbaustudien in Anwesenheit des NC-Proteins . .	99
4.4.3.1	Auswahl der experimentellen Bedingungen für die Ein- baustudien	99
4.4.3.2	Einbaustudien an einem sekundärstrukturhaltigem Sub- strat	101
4.4.3.3	Einbaustudien an einem linearen Substrat	103
4.4.3.4	Studien zum Fehleinbau in ein lineares Substrat	104
4.4.4	Einfluss des NC-Proteins auf die Dissoziation des Substrats von der HIV-1 RT	106
4.4.5	Kinetik des Nukleotideinbaus in Anwesenheit von NC	111
4.4.6	Einfluss des NCs auf die Substratdissoziation von der RT in An- wesenheit von RT-spezifischen Antikörpern	114
5	Diskussion	117
5.1	Aminosäuren in der p51 UE stabilisieren das RT-Heterodimer	117
5.2	Niedermolekulare Moleküle als Dimerisierungsinhibitoren	119
5.3	Peptidische Inhibitoren	123
5.3.1	Kurzkettenige Peptide zeigen keinen Effekt hinsichtlich der Dimer- stabilität der RT	123
5.3.2	RT-Mutanten, die eine verminderte Bindung des Peptids p7 zei- gen, sind in ihren enzymatischen Fähigkeiten eingeschränkt	125
5.4	Nukleinsäureinhibitoren	126
5.4.1	Nukleinsäuren als Dimerisierungsinhibitoren	127
5.4.2	Das DNA-Aptamer RT1t49 zeigt eine hohe Affinität zur HIV-1 RT	128
5.4.3	NRTI-resistente RTs zeigen keine Resistenz gegenüber der Pseu- doknoten-RNA und RT1t49	129
5.4.4	Ist die rationale Entwicklung von p/t-ähnlichen Nukleinsäureinhi- bitoren möglich?	130
5.5	Wechselwirkung der RT mit dem NC-Protein als Inhibitionsmöglichkeit .	131
5.5.1	Das NC-Protein erhöht die Amplitude des RT vermittelten Nu- kleotideinbaus	132
5.5.2	Das NC-Proteine stabilisiert den binären RT-Substrat-Komplex .	132

5.5.3	Der Einfluss des NC-Proteins auf die enzymatische Funktion der RT - ein Modell	134
5.6	Übergreifende Diskussion der Inhibitionsstrategien	137
6	Zusammenfassung	139
A	Abkürzungen und Definitionen	141
A.1	Abkürzungsverzeichnis	141
A.2	Definitionen	143
B	Theoretische Grundlagen der Kinetischen Methoden	145
B.1	Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Gleichgewichtstitration . .	145
B.2	Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Verdrängungstitration . .	147
B.3	Bestimmung der Pre-Steady State Geschwindigkeit des Nukleotideinbaus	148
	Literatur	149

1 Einleitung

1.1 HIV

1981 wurden die ersten Fälle einer neuen Krankheit bekannt. Die Patienten starben an seltenen Infektionen, weil ihr Immunsystem stark beeinträchtigt war. Vor mehr als zwanzig Jahren wurde das humane Immunodefizienzvirus (HIV) als Auslöser für diese Immunschwächekrankheit AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) identifiziert [7, 54, 90]. HIV ist ein Retrovirus, das der Familie der Lentiviren angehört. Retroviren besitzen typischerweise ein RNA-Genom, das im Zuge der reversen Transkription in DNA umgeschrieben und später in das Wirtsgenom integriert wird. Lange Zeit nahm man an, dass die DNA sich selbst oder eine RNA und die RNA ein Protein kodiert, dass aber in umgekehrter Richtung, also von der RNA zur DNA, keine Information fließt. Die Entdeckung der Reversen Transkriptase revolutionierte diese Ansicht und Viren, die den Mechanismus der reversen Transkription nutzen, wurden als Retroviren bezeichnet. Die Infektionen mit Lentiviren verlaufen charakteristischerweise chronisch, zeigen eine lange klinische Latenzphase, eine persistierende Virämie sowie eine Beteiligung des zentralen Nervensystems. HIV-1 ist nahe mit dem Immundefizienzvirus (SIVcpz) verwandt, das man aus Schimpansen isolieren konnte. HIV-Typ 2 (HIV-2) wurde erstmals aus einem westafrikanischen Patienten isoliert. Unabhängig von HIV-1 wurde HIV-2 vermutlich von einer Meerkatzengattung, den Mangaben, auf den Menschen übertragen. Das in Mangaben vorkommende SIVsm weist große Ähnlichkeiten zu HIV-2 Isolaten auf. Die Forschung konzentriert sich jedoch auf den HIV-Typ 1, da es der dominante Erreger von AIDS ist. Die jährlich von der Weltgesundheitsbehörde (WHO) ermittelten Zahlen zeigen die globale Dimension der Epidemie auf. Weltweit lag die Anzahl der positiv auf HIV getesteten Menschen im Jahr 2005 bei rund 40 Millionen, die Zahl der Neuinfizierten bei rund 5 Millionen Menschen und die AIDS-Epidemie forderte 3 Millionen Todesopfer. Seit Entdeckung hat die Krankheit mehr als 28 Millionen Tote gefordert. In den letzten zwei Jahrzehnten trugen Studien zur Biologie und Biochemie des Virus entscheidend zur Entwicklung antiviraler Medikamente bei.

1.1.1 Aufbau von HIV-1

1.1.1.1 Viruspartikel

Das HIV-Retrovirus ist ein behülltes Virus mit einem Durchmesser von ca. 100 nm (siehe Abbildung 1.1). Die vom Wirt stammende Hüllmembran umschließt das sogenannte Capsid. Die dem Capsid zugewandte Seite der Hüllmembran ist mit dem Matrix-Protein (MA) bedeckt. Etwa 2000 Capsid-Proteine (CA) formen den Kern des Virus, der 2 Moleküle des viralen RNA-Genoms umschließt. Die RNA wird durch das Nucleocapsid-Protein (NC) stabilisiert. Darüber hinaus enthält das Capsid die viralen Enzyme Protease (PR), Integrase (IN) und Reverse Transkriptase (RT) sowie die akzessorischen Proteine Nef (*negative factor*), Vif (Virion-Infektiositätsfaktor) und Vpr (Virion-assoziiertes Protein R).

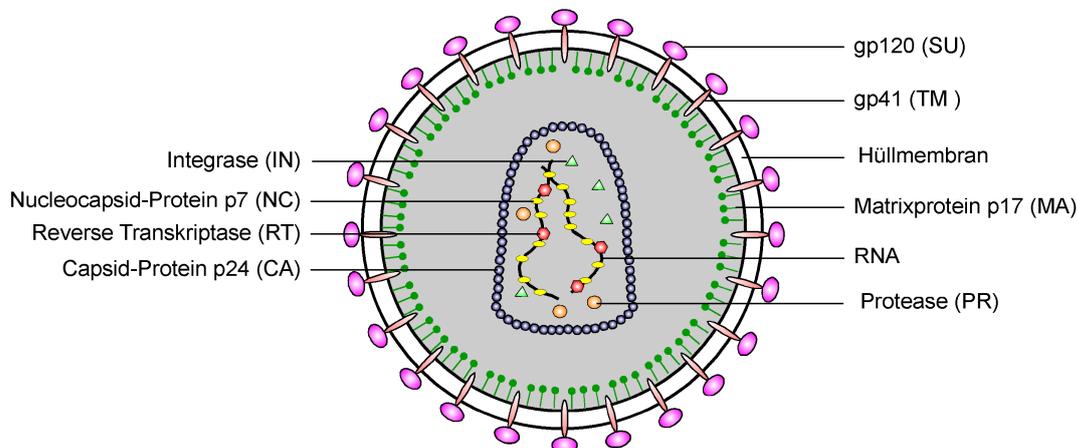


Abbildung 1.1: **Aufbau des HI-Viruspartikel.** Verändert nach [51].

1.1.1.2 Genomaufbau

Das HIV-Genom besteht aus zwei einzelsträngigen, (+)strangorientierten RNA-Molekülen, die mit einer 5'-Cap-Struktur und einem 3'-Polyadenylierungssignal alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA erfüllt. Die virale RNA weist regulatorische und strukturelle Elemente auf, die die reverse Transkription und Verpackung der RNA in das Capsid steuern:

1. TAR-Haarnadelschleife (Nt 1–55): Bindungsstelle des Transaktivators Tat
2. Primerbindungsstelle (PBS, Nt 182–199): Bindungsstelle der zellulären tRNA^{Lys3}, Initiationsstelle für die reverse Transkription.

3. Verpackungssignal (ψ , Nt 240–350): Bindung des NC-Proteins, kritisch für die Verpackung der RNA in das Virion. [23]
4. Dimerisierungsmotiv (Nt 248–271): Vermittlung der Dimerisierung zweier viraler RNAs, die in ein Virion verpackt werden [130].
5. Region der ribosomalen Leserasterverschiebung (Nt 1631–1673): uridinreiche Sequenz. In 5% der Translationsereignisse erfolgt eine Verschiebung des Leserasters um -1, was zur Folge hat, dass das Stoppcodon des Gag-Polypolypeptids überlesen wird und so ein Gag-Pol-Fusionsprotein entsteht.
6. *Rev response element* (RRE, Nt 7362–7592): Bindung des akzessorischen Proteins Rev, das den Export der mRNA aus dem Kern vermittelt.

Die ausgehend vom 5'-Ende angegebenen Positionen sind Durchschnittswerte, die zwischen den HIV-Isolaten variieren. Das HIV-Genom (siehe Abb. 1.2) kodiert für 15 Proteine, die sich gemäß ihrer Funktion in vier Gruppen einteilen lassen: Hüllproteine, Strukturproteine, Enzyme, akzessorische Proteine (zur Übersicht [51] und [152]). In die äußere Membran des Virus sind die Hüllproteine eingelagert. Zu ihnen zählen das Transmembranprotein (TM oder gp41) und das externe Glycoprotein (SU oder gp120). Gp120 befindet sich auf der Virusoberfläche und bindet die CD4-Rezeptoren, die von humanen T-Zellen und Makrophagen exprimiert werden. Das Transmembranprotein vermittelt die Fusion der viralen und zellulären Membran.

In die Klasse der Strukturproteine - die auch unter dem Begriff gruppenspezifische Antigene zusammengefasst werden - fallen das Matrix-Protein (MA), das Capsid-Protein (CA), das Nucleocapsid-Protein (NC) und das sogenannte Link-Protein (p6), die für die Bildung partikulärer Strukturen zuständig sind. Die Proteine werden vom *gag*-Gen zunächst als Polyproteine kodiert und später von der viralen Protease prozessiert.

Die enzymatischen Proteine des HI-Virus sind die Protease (PR), die Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Alle Proteine werden als *gag-pol* Fusionsprodukt translatiert. Die einzelnen Proteinkomponenten werden durch die autokatalytisch freigesetzte Protease aus dem Vorläuferprotein prozessiert. Die Reverse Transkriptase überführt die virale RNA in doppelsträngige DNA, die durch die Aktivität der Integrase in das Wirtsgenom integriert wird.

Alle anderen Proteine des HI-Virus werden als akzessorische Proteine bezeichnet. Zu ihnen zählen die Regulatorproteine Tat und Rev. Außerdem gehören die Hilfsproteine Vif, Vpr (Virion-assoziiertes Protein R), Vpu (virales Protein U) und das Nef-Protein dieser Gruppe an. Die Proteine p6, PR, Vif, RT, Vpr, IN und Nef werden in das Capsid verpackt, die akzessorischen Proteine Tat, Rev und Vpu jedoch nicht.

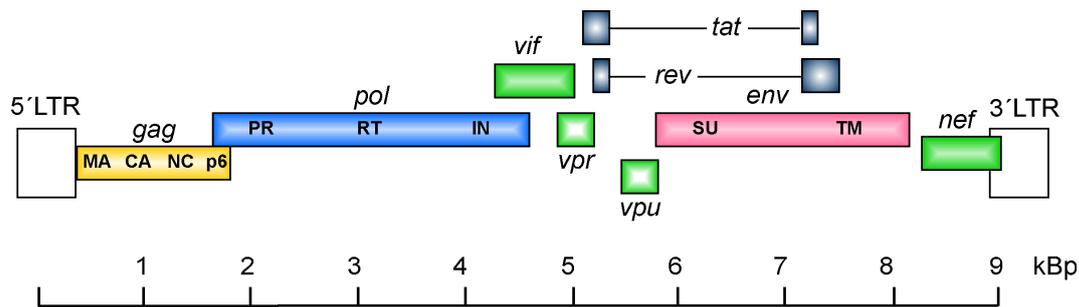


Abbildung 1.2: **Genomaufbau des HI-Virus.** In kursiver Schriftart sind die Leserahmen der Genprodukte aufgeführt. Die Exons der regulatorisch aktiven Proteine, die von gespleißten RNAs translatiert werden, sind durch Striche miteinander verbunden. Verändert nach [51].

1.1.2 Replikationszyklus

HIV infiziert vor allem Zellen, auf denen der CD4-Rezeptor exprimiert wird, wie es bei T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten der Fall ist. Eine schematische Darstellung der Replikationsereignisse ist in Abbildung 1.6 dargestellt (zur Übersicht [52]). Bevor der Viruspartikel in die Zielzelle aufgenommen wird, erfolgt eine Erkennung des zellulären Oberflächenrezeptors CD4 durch das virale gp120. Für die erfolgreiche Infektion ist zusätzlich eine Interaktion mit den zellulären Chemokinrezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 notwendig. Im Zuge der gp120-CD4-Interaktion findet im gp41-Protein eine Konformationsänderung statt, die das Fusionsereignis unterstützt. Nach Verschmelzen von Virus- und Zellmembran wird das virale Capsid in das Zytosol freigesetzt. Der anschließende Prozess der Freisetzung des Nukleinsäure-Protein-Komplexes aus dem Inneren des Capsids ist noch nicht verstanden. Die viralen Proteine MA, RT, IN, Vpr und die virale RNA werden auf diese Weise in das Zytosol entlassen, in dem zunächst die reverse Transkription stattfindet. Die RT-katalysierte DNA-Synthese wird vom NC-Protein unterstützt. Die virale DNA wird im sogenannten Präintegrationskomplex, der aus den Proteinen IN, MA, RT und Vpr besteht, zum Kern transportiert. Das virale Protein Vpr vermittelt die Kernlokalisierung des Komplexes. Die virale DNA wird durch die Integrase stabil in das Genom inseriert. Die viralen Transkripte werden ausgehend vom Promotor im 5'-LTR (*long terminal repeat*) durch die zelluläre RNA-Polymerase II synthetisiert. Die zum Teil prozessierten mRNAs werden unter Beteiligung des Rev-Proteins in das Cytosol transportiert. Nach Translation gelangen die Gag- und Gag-Pol-Genprodukte an die Zellmembran. Das Env Vorläuferprotein wird, wie auch die CD4-Rezeptoren, im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Bevor die Hüllproteine gp41 und gp120 in die virale Hüllmembran eingelagert werden, muss zunächst die Wechselwir-

sind (zur Übersicht [144]). Zu ihnen zählen beispielsweise Cyclophilin und Cyclin T. Intrazelluläre Proteine können die Replikation jedoch auch inhibieren. Das virale Protein Vif bildet einen Komplex mit den in humanen Zellen vorkommenden APOBEC3G aus (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*), das eine RNA-modifizierende Funktion besitzt. Ist Vif nicht vorhanden, ist die virale Replikation blockiert [137].

1.1.3 Die reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase schreibt das RNA-Genom in einem eleganten Mechanismus in doppelsträngige DNA um (zur Übersicht [56], [71]). Das Enzym verfügt über eine RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerisationsfunktion und besitzt zusätzlich eine RNaseH-Aktivität. Der komplexe Mechanismus der reversen Transkription ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

Als Startpunkt für die DNA-Synthese ist wie bei allen anderen DNA-Polymerasen ein Primer notwendig, der ein freies 3'-OH-Ende besitzt. Das HI-Virus nutzt die zelluläre tRNA^{Lys3}, die teilweise entwunden in einem 18 nt langen Bereich mit der viralen RNA hybridisiert. Dieser RNA-Sequenzbereich wird als *Primer Binding Site* (PBS) bezeichnet. Ausgehend von der tRNA findet die Synthese des (-)DNA-Stranges bis zum 5'-Ende der RNA statt. Da das 3'-Ende des (-)DNA-Strangs komplementär zur R-Region am 5'-Ende der RNA ist, kann die DNA an die R-Region binden und ein intra- oder intermolekularer Strangtransfer vollzogen werden. Die Synthese des (-)Stranges kann bis zum 5'-Ende der RNA fortgesetzt werden. Am 5'-Ende der RNA findet sich nun PBS-Sequenz, da die R- und U5-Region der RNA bereits durch die RNaseH-Aktivität degradiert wurden. Die Matrizen-RNA wird bis auf eine polypurinreiche Sequenz (ppt) ebenfalls degradiert. Der ppt-Bereich dient als Primer für die (+)Strangsynthese, die zunächst den LTR-Bereich (U3, R und U5) und die zur tRNA komplementären 18 Basen umfasst. Nach Hydrolyse der tRNA und des ppt-Bereiches wird es dem komplementären tRNA-Bereich möglich, mit der kopierten PBS des (-)Stranges zu hybridisieren. Dieser zweite Strangtransfer erfolgt intermolekular und führt zu einer Ringbildung. Die (+) und (-) Strangsynthese kann vollendet werden und führt zur proviralen doppelsträngigen DNA mit zwei vollständigen LTR-Regionen.

Der Mechanismus der reversen Transkription löst zwei Probleme innerhalb der Virusreplikation. Zum einen sind für die DNA-Synthese Primer notwendig, die an einen komplementären Bereich innerhalb des Virus-Genoms binden. Der Primerbereich wäre ohne den Strangtransfer der (-)Strang-DNA, die die komplementäre Primerbindungsstelle enthält, vom Syntheseprozess ausgeschlossen und würde nach Integration und Tran-

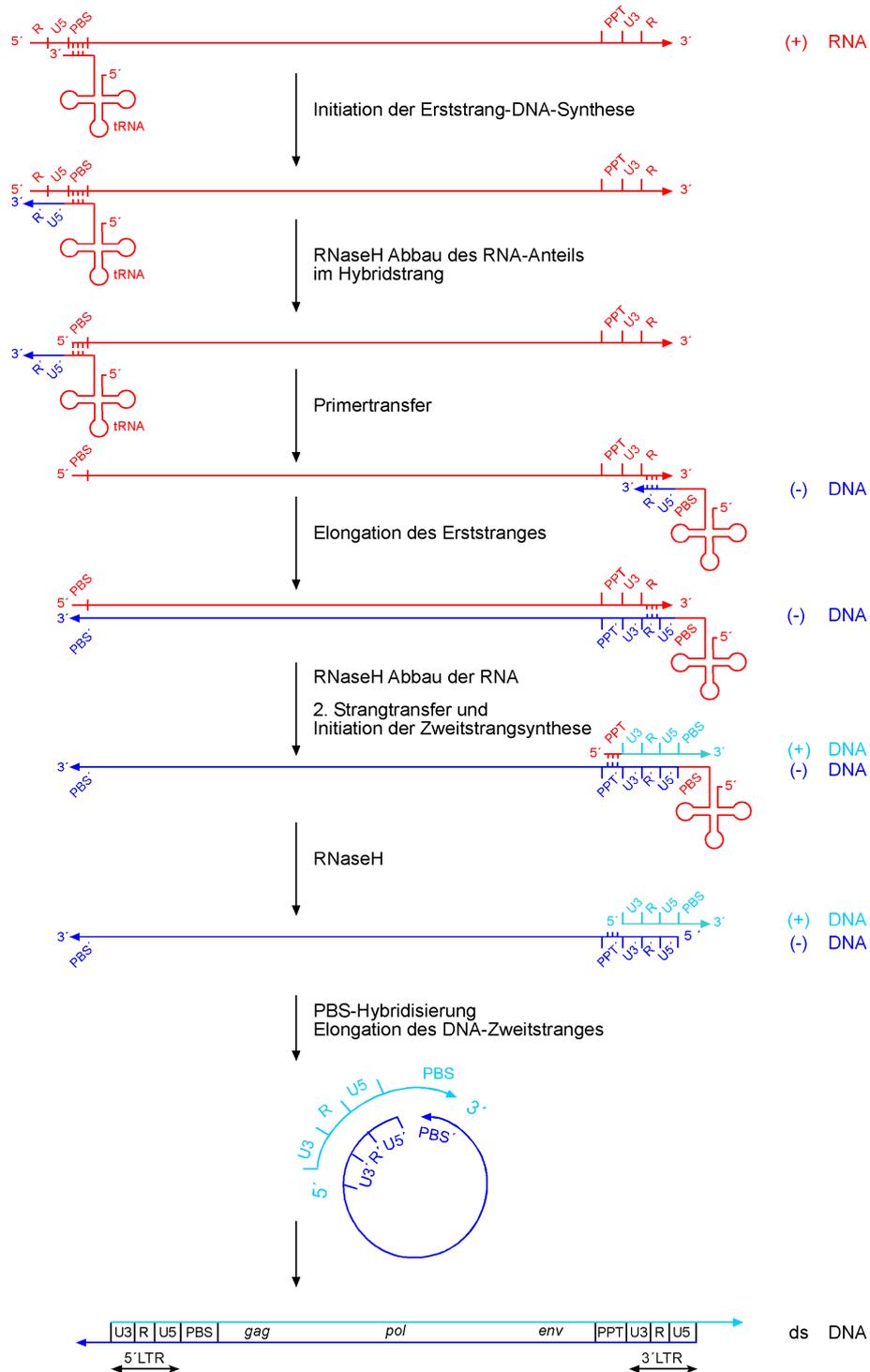


Abbildung 1.4: **Die reverse Transkription.** Erläuterungen finden sich im Text. Modifiziert nach [100].

skription der revers transkribierten DNA im viralen Genom fehlen. Zum anderen wird die virale mRNA von der zellulären RNA-Polymerase II transkribiert, die regulatorische Elemente stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle benötigt. Um beide Anforderungen im Prozess der reversen Transkription zu erfüllen, synthetisieren Retroviren am 5'- und 3'-Ende der DNA Sequenzen (U5 und U3), die nur einmal innerhalb des Genoms vorkommen. Die LTR-Sequenz (U3-R-U5) stellt zudem alle *cis*-regulatorischen Elemente zur Verfügung, die für die Integration und Expression benötigt werden.

1.2 Reverse Transkriptase

1.2.1 Struktur

Die Reverse Transkriptase (RT) wird, wie alle anderen enzymatischen Proteine auch, vom *pol* Leseraster kodiert, das als *gag-pol* Transkriptionseinheit exprimiert wird. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten (UE), die gemäß ihrem Molekulargewicht als p66 und p51 bezeichnet werden [31, 92]. Die p51 UE geht aus der p66 UE durch proteolytische Spaltung am C-Terminus hervor [45]. Studien haben gezeigt, dass nach Prozessierung des *gag-pol*-Polyproteins zunächst p66 vorliegt, das im späteren Verlauf durch die virale Protease in die p51 UE überführt wird [139]. Die beiden Untereinheiten sind daher in den ersten 440 Aminosäuren sequenzidentisch. Sehr wahrscheinlich ist, dass ein p66/p66 Homodimer als Zwischenstufe in diesem Prozess dient.

Zahlreiche Strukturuntersuchungen haben gezeigt, dass die beiden Untereinheiten trotz ihrer identischen Aminosäurabfolge gänzlich andere Konformationen einnehmen [66, 80]. Für die p66 UE sind die sogenannte Polymerase-, Verbindungs- und RNaseH-Domäne beschrieben. Die Polymerase-Domäne unterteilt sich gemäß der Nomenklatur nach Kohlstaedt *et al.* in Finger-, Daumen-, Handflächendomäne. Diese bilden die für Polymerasen typische Form einer rechten Hand aus. P51 und p66 bilden eine Nukleinsäurebindungsfurche, die von der Polymerase- bis zur RNaseH-Domäne reicht. Die katalytische Triade wird von den Asparaginsäuren an Position 185 und 186 sowie einem weiteren hochkonservierten Aspartat an Position 110 geformt [87]. Während die p66 UE alle enzymatischen Funktionen beherbergt (RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität, RNaseH-Aktivität), ist die p51 Untereinheit katalytisch inaktiv und dient als Stabilisator der großen Untereinheit. Das Enzym ist dennoch nur als Dimer funktionsfähig [117, 118].

Die biologisch aktive Form bildet sich in einem zweistufigen Dimerisierungsprozess aus [36] (siehe Schema in Abbildung 1.5). Der raschen, konzentrationsabhängigen Assoziation der zwei Untereinheiten in ein inaktives Heterodimer folgt eine konzentrationsun-



Abbildung 1.5: **Minimalschema der HIV RT Dimerisierungsreaktion.** Das Sternsymbol kennzeichnet einen veränderten strukturellen Zustand des Heterodimers (siehe Text).

abhängige langsame Konformationsänderung. Erst nach dieser Konformationsänderung ist das Protein katalytisch aktiv. Für die Interaktion der RT Untereinheiten sind drei Kontaktbereiche beschrieben [8, 37, 156]. Die Protein-Protein-Wechselwirkung wird innerhalb der p51 UE von Daumen-, Verbindungs- und Fingerdomäne vermittelt, die mit der (in ebendieser Abfolge) RNaseH-, Verbindungs- und Handflächendomäne in p66 interagieren. Die schnelle Assoziation der Untereinheiten erfolgt vermutlich über hydrophobe Aminosäuren in den Verbindungsdomänen von p51 und p66. Im sogenannten Tryptophan-Cluster, das von Aminosäure 396 bis 414 reicht, finden sich sechs Tryptophane und ein Tyrosin, von denen vor allem W401 und Y405 in der p66 UE und W410 in der p51 UE essentiell für die Dimerstabilität sind [102, 148].

Als Polymerase ist die RT in der Lage, Nukleinsäuren zu binden. Die Kristallstrukturen eines binären Komplexes aus RT und DNA:DNA [66, 80] bzw. DNA:RNA Substrat [134] zeigten, dass die Protein-Nukleinsäurekontakte vor allem zwischen den Aminosäuren der Finger-, Handflächen- und Daumendomäne der p66 UE und dem Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren ausgebildet werden. Zusätzliche Interaktionen finden zwischen Aminosäuren der RNaseH-Domäne und dem Primer-Strang des Substrats statt. Strukturanalysen und Quervernetzungsexperimente [40] enthüllten darüber hinaus, dass der p51 UE auch eine Rolle in der Substrat- bzw. tRNA^{Lys3}-Bindung zukommt, die über die Finger- und Verbindungsdomäne vermittelt wird. Die so gebildete Bindungsfurche erstreckt sich über 60 Å vom N-Terminus der Polymerasedomäne zum C-terminalen Ende der RNaseH-Domäne. Der Abstand zwischen den aktiven Zentren von Polymerase- und RNase-Domäne beträgt 17 (DNA:DNA) bzw. 18 (RNA:DNA) Basenpaare [55, 134, 135, 160]. Nahe dem aktiven Zentrum der Polymerasedomäne nimmt der Substratdoppelstrang A-Form an, der durch einen Knick von 40 bis 45 Grad in einem 3–4 Basenpaare langen Bereich in die B-Form übergeht [32]. Eine Haarnadelschleife zwischen den β -Strängen β 12 und β 13 (AS 227 bis 235) positioniert das 3'-Ende des Primers für den nukleophilen Angriff auf das einzubauende dNTP [106]. Die Struktur der HIV-1 RT in An- oder Abwesenheit des Substrats unterscheidet sich in einer ausgeprägten Konformationsänderung der p66 Daumendomäne. Bei Bindung des Substrats klappt diese Domäne um ca. 40 Grad nach außen, sodass die Bindungsfurche frei zugänglich vorliegt [63, 124]. Liegt die RT unkomplexiert vor, befindet sie sich vorwiegend in der geschlossenen Konformation,

bei der die Finger- und Daumen-Subdomänen in nahem Kontakt zueinander stehen.

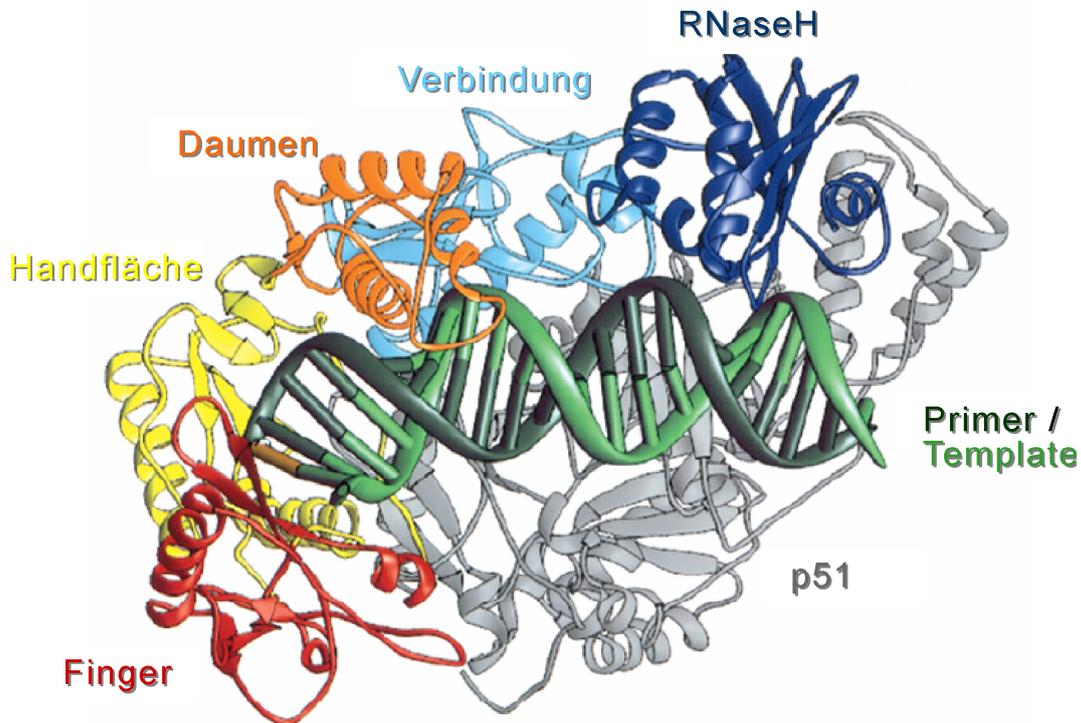


Abbildung 1.6: **Die Struktur der HIV-1 Reversen Transkriptase.** Gezeigt ist eine Kokristallstruktur aus RT und Primer/Template. Die p66 Untereinheit der Reversen Transkriptase besteht aus Finger- (rot), Handflächen- (gelb), Daumen- (orange), Verbindungs- (hellblau) und RNaseH- (dunkelblau) Domäne. Die p51 Untereinheit ist in grau gezeigt. Ein DNA/DNA (21/25mer) Substrat ist in grün (Primer: dunkelgrün, Template: hellgrün) und das nächst einzubauende Nukleotid in gold dargestellt. Modifiziert nach [63]

1.2.2 Substratbindung und Nukleotid-Inkorporation durch die Reverse Transkriptase

Die durch die Reverse Transkriptase vermittelte Nukleotidinkorporationsreaktion konnte durch umfassende kinetische Methoden in Kombination mit hochauflösenden Röntgenstrukturuntersuchungen analysiert werden. Die DNA-Synthese folgt einem geordneten Mechanismus, der vergleichbar zu anderen Polymerasen ist [73, 129] (siehe Abbildung 1.7). Im ersten Schritt bindet das Primer/Template-Substrat (p/t) an das freie Enzym (binärer Komplex). Erst danach wird der Komplex um das dNTP erweitert (ternärer Komplex, Schritt 3). Die sich anschließende Konformationsänderung des ternären Kom-

plexes ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der Polymerisation (Schritt 4). Danach kann der nukleophile Angriff des freien 3'-OH-Endes des Primers auf das α -Phosphat des gebundenen Nukleotids erfolgen und die Phosphodiesterbindung ausgebildet werden (Schritt 5). Eine erneute Konformationsänderung erlaubt die Freigabe des entstandenen Pyrophosphats (PP_i , Schritt 6). Nach Einbau des Nukleotids kann das Substrat vom Enzym dissoziieren (distributiver Mechanismus) oder um eine Position verschoben werden, sodass das 3'-Ende für einen weiteren Einbauschnitt zur Verfügung steht (prozessiver Mechanismus).

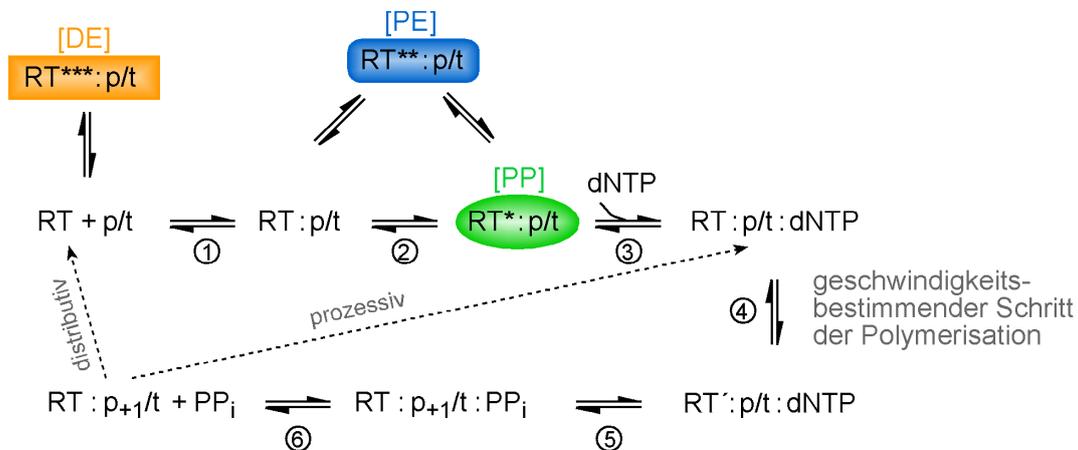


Abbildung 1.7: **Mechanistisches Modell der HIV-1 RT Polymerasereaktion.** RT-Moleküle, die sich nicht in ihrer Zusammensetzung, aber in ihrer Konformation unterscheiden, sind durch Sterne gekennzeichnet. Die als RT' gekennzeichnete Version im RT:p/t:dNTP Komplex weist eine andere Konformation nach Schritt 4 auf. PP: produktiver Komplex im Produkt-Status, PE: produktiver Komplex im Edukt-Status, DE: *dead end* Komplex.

Stopped Flow Messungen ergaben, dass die Substrat-Bindung in 2 Schritten abläuft [123, 158]. Die Ausbildung des Kollisionskomplexes ist diffusionskontrolliert und konzentrationsabhängig. Darauf folgt mindestens 1 Isomerisierungsschritt (Schritt 2). Wöhrl *et al.* diskutieren die Möglichkeit zwei unabhängig voneinander auftretender Konformationsänderungen [158]. In Gleichgewichtsfluoreszenzmessungen wurde für die p/t-RT-Bindung ein K_d von 1–2 nM ermittelt [33, 82, 149]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass drei verschiedene RT-Substrat-Komplexe ausgebildet werden, die sich unter anderem durch ihre Fähigkeit zum Nukleotideinbau unterscheiden. Unterstützt wurden die kinetischen Daten durch Einzelmolekülmessungen, die zusätzlich Informationen über die Struktur der Komplexe lieferten [128]. Die DNA kann in Form eines produktiven Komplexes mit der RT vorliegen (produktiver Komplex in Produkt-Status [PP], in Abbildung 1.7 in grün

dargestellt). Der Primer kann in diesem Zustand umgehend um ein Nukleotid verlängert werden. Im zweiten Komplex besetzt das Primerende die dNTP-Bindungstasche, sodass für den Nukleotideinbau eine Konformationsänderung aber keine Dissoziation des Substrats erforderlich ist (produktiver Komplex in Edukt-Status [PE], in Abbildung 1.7 in blau dargestellt). Der dritte RT-DNA-Komplex wird als *dead end* Komplex bezeichnet, da ein Nukleotideinbau in diesem Bindungsmodus nicht möglich ist (in Abbildung 1.7 in orange dargestellt). Hier muss das p/t zunächst dissoziieren und in einem erneuten Bindungsschritt einen produktiven Komplex ausbilden. Für die Bindung des dNTPs konnte ein K_d von 5–10 μM ermittelt werden [26, 123, 158]. Dieser Wert ist um den Faktor 20 erhöht, wenn keine Watson-Crick-Basenpaarung vorliegt und ein Falscheinbau erfolgt [26].

Transientenkinetische Einzelnukleotid-Einbaustudien zeigten, dass die Produktbildung in zwei exponentiellen Phasen mit Polymerisationsraten von 20–60 s^{-1} und 0,4–0,7 s^{-1} erfolgt, sodass die Existenz der beiden Formen des produktiven Komplexes als katalytisch aktiv eingeordnet werden konnten [81]. An die exponentiellen Phasen schließt sich eine lineare Phase an (k_{cat} 0,04–0,15 s^{-1}). Die sehr langsame Einbaukinetik ist auf die Dissoziation und Reassoziierung des Substrats zurückzuführen, das sich im *dead-end* Komplex befand. Dadurch wird eine zeitlich verzögerte Verlängerung des Primers verzeichnet.

Der doppelt exponentielle Verlauf der Produktbildung wurde auch für Substrate gezeigt, die eine Sekundärstruktur im Template-Strang enthalten [147]. Die Sekundärstruktur beeinflusst die Affinität des Substrats zur RT und lag für das von Suo *et al.* gewählte Beispielsubstrat bei 16–86 nM [147]. Der Einbau des nächsten Nukleotid-Substrats erfordert zunächst die Entwindung der Sekundärstruktur. Die bestimmten Polymerisationsraten sind daher im Vergleich zum linearen Substrat verlangsamt (k_{pol} 10–19 s^{-1} und 0,015–0,067 s^{-1}).

1.3 Nucleocapsid-Protein (NC)

Retroviren kodieren für die sogenannten antigenspezifischen Proteine (MA, CA und NC), die als Gag-Polyprotein synthetisiert werden. Das Gag-Fusionsprotein bindet während der Ausbildung des neuen Viruspartikels die virale RNA über das sogenannte Verpackungssignal (*ψ -site*). Für die spezifische Erkennung ist das Nucleocapsid-Protein verantwortlich, das in allen Retroviren zu finden ist. Auch nach der proteolytischen Spaltung des Gag-Proteins bleibt das NC-Protein mit der viralen RNA assoziiert und bildet einen Histon-ähnlichen Protein-Nukleinsäurekomplex aus. NC-Proteine sind sehr basisch (PI zwischen 10 und 11) und weisen eine nur sehr kurze Aminosäuresequenz auf; das NC

des HI-Virus ist beispielsweise 55 AS lang. Mit Ausnahme der Spumaviren weisen die retroviralen NCs typischerweise ein oder zwei der sogenannten Zinkknöchel mit der Aminosäureabfolge $CX_2CX_4HX_4C$ (X stellt eine variable Aminosäure dar) auf. Mutationen innerhalb dieser Sequenz verhindern die Bindung der viralen RNA und damit die korrekte Verpackung der RNA in die viralen Partikel, die damit nicht mehr infektiös sind [112].

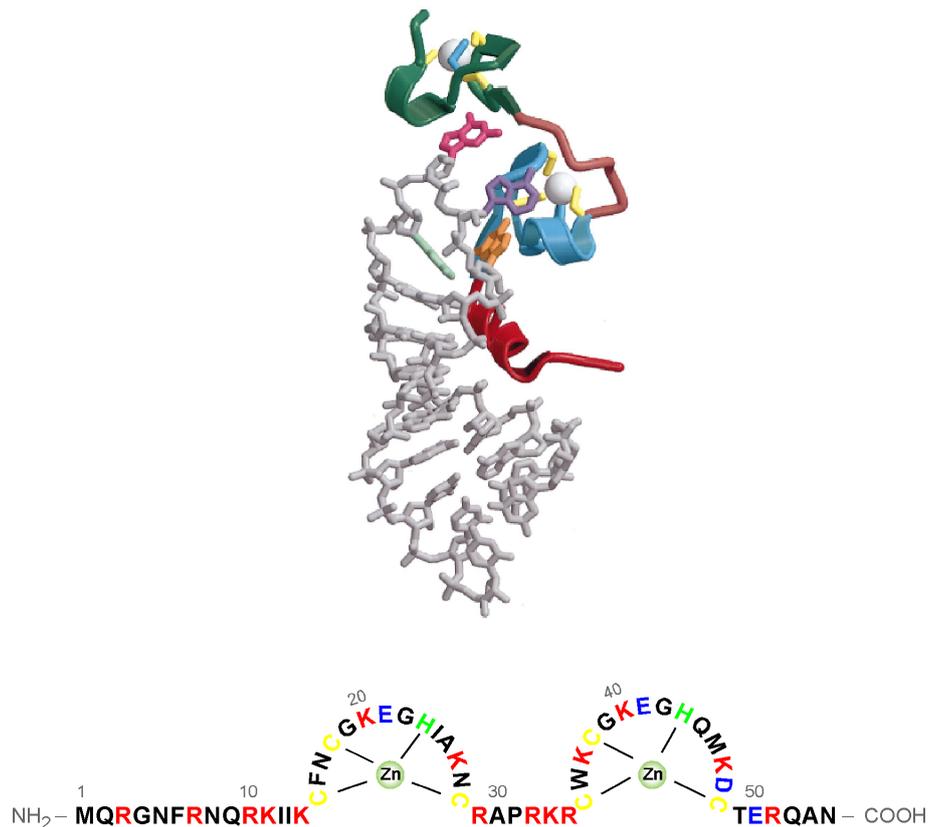


Abbildung 1.8: **Struktur und Sequenz des HIV-1 Nucleocapsids.** Die 3D-Struktur des NC-Proteins im Komplex mit der SL3-RNA. Die Struktur wurde über NMR-Studien bestimmt [28]. Die 12 N-terminalen Aminosäuren sind in rot, die zwei Zinkfinger in blau und grün, die Zinkionen in weiß und die RNA in grau gezeigt. Die Purinbasen des Loops sind grün, pink, lila und orange eingefärbt. Zusätzlich ist die Aminosäureabfolge des NC-Proteins gezeigt (HIV-Isolat MN). Basische Aminosäuren sind rot, saure Aminosäuren blau und Zink-chelatierende Aminosäuren grün oder gelb dargestellt.

Für das NC des HI-Virus liegen verschiedene NMR-Strukturen vor [88, 146]. Zusätzlich ist es gelungen, die Struktur von NC-Nukleinsäure-Komplexen durch NMR-Studien zu charakterisieren [1, 28]. Als Nukleinsäure wurden die im Verpackungssignal vorhandenen Haarnadelstrukturen SL2 und SL3 ausgewählt. Das NC bindet mit einer Affinität im nanomolaren Bereich an diese Sequenzen [138]. Beide Strukturen zeigen, dass die Zinkknöchel primär über die hydrophoben Aminosäuren (Phe16 und Trp36) mit den einzelsträngigen Bereichen der Haarnadelstruktur interagieren, während die kationische N-terminale Domäne über elektrostatische Wechselwirkungen an die Stammstruktur bindet. In diesen und anderen Studien zeigte sich, dass das NC bevorzugt mit Guanosinen interagiert [11, 46]. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass das NC-Protein auch unspezifisch mit Nukleinsäuren viraler und nicht viraler Herkunft interagieren kann (zur Übersicht [89, 113]). Übereinstimmend wird in der Literatur berichtet, dass ein NC-Molekül etwa 5 bis 8 Nukleotide in der Nukleinsäuresequenz abdeckt (u.a. [75], [77] und [153]). Nucleocapsid-Proteine verfügen über eine ungewöhnliche biochemische Aktivität - NC-Proteine agieren als Nukleinsäure-Chaperone. Das Protein katalysiert die Entwindung von doppelsträngigen Nukleinsäurebereichen. Die Nukleinsäuren können alternative Nukleinsäurestrukturen einnehmen, die energetisch stabiler sind. Oftmals können durch die Chaperonaktivität des NCs suboptimale Konformationen überwunden werden (zur Übersicht [6]).

Aufgrund seiner Eigenschaften ist das NC-Protein nahezu in jeden Schritt des Replikationszyklus involviert. Das NC unterstützt die Dimerisierung der zwei viralen RNA-Moleküle [4, 104] und die tRNA-Hybridisierung an die virale RNA [22, 44, 86, 91]. Es ist an der Verpackung des RNA-Genoms [12] und an den Strangtransfer-Reaktionen beteiligt [70, 105, 161]. Außerdem reduziert das NC das sogenannte Pausieren der RT an sekundärstrukturhaltigen Abschnitten der RNA [39, 68, 79, 162].

Da das NC essentiell für die Vermehrung des Virus ist, wurde es als interessantes Zielprotein für virale Inhibitoren angesehen. Die bisher beschriebenen Inhibitoren wirken auf unterschiedliche Art und Weise: Inhibitoren, die mit den NC-katalysierten Vorgängen interferieren ohne selbst an das NC zu binden, und Inhibitoren, die direkt mit dem NC interagieren und seine Funktionalität beeinträchtigen. Actinomycin D ist ein Beispiel für die erste Strategie. Es interagiert mit dem initiierten (-)DNA-Strang und verhindert den ersten Strangtransfer *in vitro*. Das NC-Protein konnte diesen inhibitorischen Effekt nicht überwinden [58]. Als Beispiel für den zweiten Ansatz wurde in der Literatur über hydrophobe, mild oxidierende Agenzien berichtet, die die Cysteine des NC-Proteins über Disulfidbrücken verknüpfen und damit das NC-Protein inaktivieren [114, 121]. Der hydrophobe Charakter der Substanzen erleichtert die Aufnahme in die Zelle. Obwohl diese Chemikalien unspezifisch wirken, waren sie für die Zelle nicht toxisch.

1.4 Therapie und Resistenz

23 Jahre HIV-Forschung heißt auch 23 Jahre der Inhibitor- und Medikamentenentwicklung (zur Übersicht [109, 122]). In Abbildung 1.6 sind die Angriffspunkte der momentan genutzten Inhibitoren verzeichnet (rote Schrift). Nachdem das HI-Virus als Ursache für die erworbene Immunschwächekrankheit identifiziert wurde, profitierte die Medikamentenentwicklung in der ersten Zeit von Erkenntnissen in der Polymeraseforschung, da Polymeraseinhibitoren bereits für Infektionen mit Herpes-Viren eingesetzt wurden. Das erste zugelassene HIV-Medikament war im Jahr 1987 das Nukleosid-Analogon Zidovudin (AZT) [42]. Die Klasse der nukleosidischen RT-Inhibitoren (NRTI), zu denen AZT gehört, können wie die natürlichen Desoxynukleotide in den DNA-Strang eingebaut werden. Nach Einbau kommt es jedoch zum Strangabbruch, da den NRTIs das freie 3'-OH-Ende fehlt. AZT wirkt spezifisch auf die Reverse Transkriptase. Die humanen Polymerasen α und β werden um einen Faktor 100 schlechter inhibiert als die RT. Lediglich die mitochondriale Polymerase γ wird ebenfalls durch AZT gehemmt. Neben AZT wurden in der Folgezeit weitere NRTIs, wie beispielsweise ddI, ABC und 3TC identifiziert und zur HIV-Therapie zugelassen.

Die Therapie mit nukleosidischen RT-Inhibitoren war anfänglich sehr vielversprechend. Patienten, die mit NRTIs in Monotherapie behandelt wurden, zeigten jedoch nach einiger Zeit einen erhöhten viralen RNA-Spiegel, die Zahl der CD4-Zellen war rückläufig. Molekularbiologische Studien zeigten, dass Mutationen innerhalb des *pol*-Gens vorlagen, die sich in Aminosäureaustauschen innerhalb der Sequenz der Reversen Transkriptase niederschlugen. Doch woher stammten diese Mutationen? Die HIV-1 RT weist eine hohe Fehlerrate und keine Exonukleasefunktion auf, sodass pro 2000–5000 Nukleotide eine falsche Base in die provirale DNA eingebaut wird [96]. Die Genauigkeit der humanen RNA-Polymerase II, die für die mRNA-Synthese verantwortlich ist, ist ebenfalls gering. Im Zusammenspiel mit den auftretenden Rekombinationsereignissen [62] führt dies zu einer genetischen Diversität des viralen Genoms. Mutationen, die zu einer Resistenz gegenüber den eingesetzten Medikamenten führen, werden in wenigen Replikationszyklen selektiert. Die NRTI-assoziierten Resistenzmutationen (zur Übersicht [98, 107]) betreffen vor allem Aminosäuren im Bereich des katalytischen Zentrums. Zusätzlich finden sich Mutationen in der Fingerdomäne der p66 UE. Dieser Bereich ist für die Bindung des nächstinzubauenden dNTPs zuständig. Die Mutation M184V vermittelt die Resistenz gegenüber 3TC. Aminosäuren mit β -Verzweigungen im Molekül (wie Valin, Isoleucin und Threonin) interferieren mit der Bindung des Inhibitors, da die Aminosäureverzweigung eine sterische Blockade für den Oxathiolenring von 3TC darstellt. Die Bindung der natürlichen Nukleotide bleibt davon unbeeinflusst [132].

1995 wurde eine weitere Substanzklasse als HIV-Inhibitoren zugelassen, die gegen das Enzym Protease gerichtet sind [154]. Die virale Protease ist ein Homodimer, dessen Reaktionszentrum innerhalb der hydrophoben Dimerisierungsfläche zu finden ist. Proteaseinhibitoren sind Peptidanaloga, die als Substratkompetitoren wirken. Die Aminosäureabfolge der Proteaseschnittstelle findet sich in den Peptidanaloga, die Peptidbindung der Schnittstelle ist allerdings so modifiziert, dass eine Spaltung nicht möglich ist. Der Weg vom *in vitro* Proteaseinhibitoren bis zum Medikament war lang, da Peptide oft schlecht löslich sind und die Zellmembranen nur schwer passieren können. Durch Modifikationen war es möglich, die Peptide in eine applizierbare Form umzuwandeln. Die Inaktivierung der Protease verhindert die Reifung der viralen Partikel. Die Gag und Gag-Pol-Vorläuferproteine können nicht in die einzelnen Proteinkomponenten gespalten werden, sodass kein stabiles und replikationsfähiges Virus entstehen kann. Mutationen, die eine Resistenz gegen Protease-Inhibitoren vermitteln, finden sich zumeist in der Nähe der Substratbindungstasche. Allerdings ist für eine vollständige Resistenz der Aminosäureaustausch an zwei oder mehr Positionen erforderlich.

Nukleosid-Analoga (NRTI)		NRTI-Kombinationen		Protease-Hemmer	
Abacavir (ABC)	Ziagen [®]	3TC + AZT	Comibvir [®]	Amprenavir (APV)	Agenerase [®]
Didanosin (ddl)	Videx [®]	3TC + AZT + ABC	Trizivir [®]	Atazanavir (ATV)	Reyataz [®]
Emtricitabin (FTC)	Emtriva [®]	3TC + ABC	Kivexa [®]	Fosamprenavir (FPV)	Telzir [®]
Lamivudin (3TC)	Epivir [®]	TDF + FTC	Truvada [®]	Indinavir (IDV)	Crixivan [®]
Stavudin (D4T)	Zerit [®]			Nelfinavir (NFV)	Viracept [®]
Zalcitabin (ddC)	Hivid [®]			Saquinavir (SQV)	Invirase [®]
Zidovudin (AZT)	Retrovir [®]			Tipranavir (TPV)	Fortovase [®]
					Aptivus [®]
Nukleotid-Analoga (NRTI)		Nicht-Nukleosid-Analoga (NNRTI)		Fusionsinhibitoren	
Tenofovir (TDF)	Viread [®]	Efavirenz (EFV)	Sustiva [®]	Enfuvirtide (T20)	Fuzeon [®]
		Nevirapin (NVP)	Viramuné [®]		

Tabelle 1: Übersicht der in Deutschland zugelassenen HIV-Medikamente.

Ein Jahr später wurde Nevirapin, der erste nicht-nukleosidische Inhibitor gegen die Reverse Transkriptase (NNRTI), zugelassen. NNRTIs binden innerhalb einer hydrophoben Tasche in der RT-Struktur, die 10–15 Å vom Reaktionszentrum entfernt liegt [27]. Die Bindung induziert eine Konformationsänderung in der RT, die zur Inhibition der Polymeraseaktivität führt. Punktmutationen innerhalb der RT-Sequenz reichen bereits aus, um eine Resistenz gegen die Substanzklasse der NNRTIs zu vermitteln. Die Mutationen lassen sich in drei Aminosäurebereiche (p66: AS 98–108, 179–190, 225–236) einteilen. Die über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kontakte vermittelten Interaktionen zwischen RT und den polyzyklischen Inhibitoren werden durch die Mutationen reduziert. Ein Aminosäureaustausch an Position 318 der p51 UE konnte ebenfalls unter den Resistenzmutationen ausgemacht werden.

Eine Übersicht über die heute in Deutschland zugelassenen HIV-Medikamente ist in Tabelle 1 zu finden. In der Liste ist ein Fusionsinhibitor aufgeführt, der seit 2003 in der HIV-Therapie eingesetzt wird. Enfuvirtide (T20) ist ein lineares Peptid (36 Aminosäuren), das den Eintritt des Virus in die Wirtszelle beeinträchtigt [78]. Die Bindung des gp120 an den CD4-Rezeptor resultiert in einer Konformationsänderung des gp41, die die Fusion der Zellmembran mit der viralen Membran induziert. Das Peptid entspricht dem HR2-Fragment der extrazellulären Domäne des viralen gp41 Proteins. Die T20-Bindung an gp41 verhindert die Membranfusion und somit die Infektion der Zelle. Bei allem Erfolg dieses neuartigen Inhibitors bleiben jedoch limitierende Faktoren, die die Anwendung von T20 einschränken. T20 kann nicht in Tablettenform eingenommen, sondern muss subkutan verabreicht werden. Darüber hinaus ist die Synthese von T20 sehr kostenaufwendig.

Immer öfter wurden unterschiedliche Inhibitorklassen in der HIV-Therapie kombiniert. Die als HAART-Therapie (*highly active antiretroviral therapy*) bezeichnete Kombination von 3 oder mehr der antiretroviralen Medikamente (meist 1 oder 2 NRTIs, 1 NNRTI und/oder 1 Protease-Inhibitor) und führte zu langanhaltenden Erfolgen in der Verlängerung der Latenzzeit [53]. Das Aufkommen von Resistenzmutationen ist stark verlangsamt, da die virale Replikation an unterschiedlichen Stationen blockiert wird. Neben zahlreichen Nebenwirkungen (gastrointestinale Nebenwirkungen, Blutbildveränderungen, ZNS-Nebenwirkungen, Lipoatrophie, Dyslipidämie und Veränderungen der Knochendichte und Nierenfunktion) [19], die die HAART-Therapie begleiten, bleibt nach wie vor das Problem, das HAART nicht alle HIV-Reservoirs im Körper erreicht. Die virale Replikation bleibt auch unter HAART-Behandlung beispielsweise in Zellen des zentralen Nervensystems erhalten.

Das Aufkommen von Resistenzmutationen und die zahlreichen Nebenwirkungen erfor-

dern nach wie vor die Ausweitung der bekannten Inhibitor Klassen [133] und die Entwicklung neuer antiretroviraler Substanzen. Strukturelle und zellbiologische Untersuchungen kombiniert mit biochemischen Charakterisierungen erweitern das Verständnis des Replikationsmechanismus, sodass immer wieder vielversprechende neue Ansätze zur Inhibitor-Entwicklung beschrieben werden. Neu entwickelte Strategien (zur Übersicht [24], [57] und [99]) schließen beispielsweise die viralen Proteine Vif, Tat, Integrase und NC als Zielproteine ein. Darüber hinaus wird die Möglichkeit untersucht, die verschiedenen Schritte während des HIV-Eintritts [17] und die Assemblierung des viralen Partikels zu blockieren. Zusätzlich wird die Inhibition der viralen Replikation durch siRNA-vermittelten Abbau der viralen mRNA [126] und die Möglichkeit der Gentherapie [145] diskutiert.

1.5 Zielstellung

In dieser Arbeit sollten am Beispiel der HIV-1 Reversen Transkriptase vielfältige neue Therapieansätze entwickelt und getestet werden. Im Hinblick auf die bekannten Therapieprobleme sollten Themengebiete wie Resistenzentwicklung gegenüber alternativen Wirkstoffen und Inhibition NRTI-resistenter RT-Mutanten beleuchtet werden.

Die Dimerisierung des Enzyms steht schon seit längerem als Angriffspunkt für eine effektive Therapie zur Diskussion, da die RT ausschließlich in seiner dimeren Form aktiv ist. In der Dimerisierungsdomäne der p51 UE sollten über Mutationsstudien die Aminosäuren identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Dimerisierung der Untereinheiten haben. Aufbauend auf diesen Daten sollte getestet werden, ob verschiedene Molekülklassen (Nukleinsäuren, Peptide, niedermolekulare Moleküle) den Dimerisierungsprozess beeinflussen können und die Aktivität der RT auf diese Weise verringert werden kann.

Neben den klinisch eingesetzten RT-Inhibitoren sind u.a. peptidische Wirkstoffe und Nukleinsäuren als Inhibitoren der enzymatischen Aktivität der RT bekannt [61, 141]. Für den peptidischen Inhibitor p7 sollte überprüft werden, inwieweit sich mögliche Resistenzmutationen auf die Aktivität der RT auswirken. Für die Aptamere RT1t49 und die Pseudoknoten-RNA sollte untersucht werden, ob das inhibitorische Potenzial dieser Nukleinsäurewirkstoffe auch gegenüber NRTI-resistenten RT-Mutanten erhalten bleibt. Das virale Nucleocapsid-Protein (NC) ist in vielfältiger Weise in den Prozess der reversen Transkription involviert [89]. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob sich die Anwesenheit des Proteins auf die RT-vermittelten Polymerisationsereignisse auswirkt. Zeitaufgelöste Messungen des Polymerisationsprozesses in Anwesenheit des NCs sollten einen detaillierten Einblick in den Mechanismus der NC-RT-Interaktion geben und aufklären, ob eine Blockade der Wechselwirkung zwischen RT und NC als Inhibitionsmöglichkeit in Frage kommt.

2 Material

2.1 Allgemeines

Für alle Lösungen und Puffer wurde hochreines Milli-Q-Wasser (MILLIPORE WATERS, Neu Isenburg) verwendet. Es entspricht der Qualität *aqua bidestillata* und wird im weiteren nur als H₂O bezeichnet. Die verwendeten Chemikalien wurden von gängigen Herstellern bezogen und hatten den Reinheitsgrad *pro analysi*, sofern es nicht anders angegeben ist.

Im folgenden sind die Firmensitze der Lieferanten aufgeführt und werden im weiteren nicht mehr angegeben, um eine gehäufte Nennung zu vermeiden. Bandelin (Berlin, Deutschland), Beckmann/Coulter (Fullerton, CA, USA), Bender & Hobein (Zürich, Schweiz), Biometra (Göttingen, Deutschland), Bio-Rad (München, Deutschland), Bischoff (Leonberg, Deutschland), Branson (Danbury, CT, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Faust (Bochum, Deutschland), Fermentas (Burlington, Kanada), Fuji-film (Tokio, Japan), GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK), Gibco-BRL (Eggestein, Deutschland), Greiner (Frickhausen, Deutschland), Hellma (Müllheim, Deutschland), Hettich (Tuttlingen, Deutschland), Hoefer (San Francisco, CA, USA), Horiba Jobin Yvon (Edison, NJ, USA), IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), KinTek (Austin, TX, USA), Knick (Berlin, Deutschland), Labsystems (Helsinki, Finnland), Macherey & Nagel (Düren, Deutschland), Mettler-Toledo (Gießen, Deutschland), Millipore (Witten, Deutschland), New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Perkin Elmer (Boston, MA, USA), Promega (Mannheim, Deutschland), Roche (Basel, Schweiz), Qiagen (Hilden, Deutschland), Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Sorvall (Asheville, USA), Spectrum (Breda, Niederlande), Thermo (Waltham, MA, USA), Waters (Milford, MA, USA), Whatman (Kent, UK).

2.2 Verbrauchsmaterial

DEAE-Papier (DE-81)
GB002, GB 003 Blotting-Papier

Whatman
Whatman

Mikrotiterplatten (96-well-Format)	Greiner
Nylonmembran Hybond N ⁺	GE Healthcare
PCR Purification Kit	Qiagen
Phase Lock Gel	Eppendorf
Polygram CEL 3000 PEI/UV ₂₅₄	Macherey & Nagel
Protein LoBind Tubes	Eppendorf
QIAquickGel Extraction Kit	Qiagen
QIAspin Miniprep Kit	Qiagen
Plasmid Midi-Präp Kit	Qiagen
Ultrafiltrationseinheit 30 MWCO (Amicon)	Millipore

2.3 Säulen und Säulenmaterial

DEAE-Sepharose	GE Healthcare
Gelfiltrationssäulen NAP, G-25	GE Healthcare
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare
Heparin Sepharose CL-6B	GE Healthcare
HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade	GE Healthcare
HiTrap SP (5ml)	GE Healthcare
Ni-NTA Sephadex-superflow	Qiagen
Prontosil 120-3-C18	Bischoff
Source 15S	GE Healthcare
Superdex 200 HR10/30	GE Healthcare

2.4 Geräte

Agarose-Gelkammer Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad
Biotrap Elektrophoresekammer	Schleicher & Schuell
Detektor Waters 484E und 490E	Waters
Elektrophoresis Power Supply - EPS 3500	GE Healthcare
Elektroporationsgerät	Bio-Rad
Elektroporationsküvette	Bio-Rad
Feinwaage METTLER PM 480 Delta Range	Mettler-Toledo
Fluoreszenz/Lumineszenz-Fluoroskan	Labsystems
Ascent (R) FL	
Image Eraser	GE Healthcare
FPLC-Anlage Waters 550E	Waters
Fraktionssammler GradiFrac	GE-Healthcare
Fluoreszenzspektrophotometer FluoroMax-3	Horiba Jobin Yvon
Flüssigszintillationszähler Wallac 1409	PerkinElmer (LSA)

Geltrockner	Bio-Rad
HPLC-Anlage Waters 510	Waters
Imaging Plate für Bio Imaging Analyzer	Fujifilm
Netzgerät BioRad Power Pac 300 und 3000	Bio-Rad
Netzgerät LKB ECPS 3000/150	GE Healthcare
PCR-Gerät Uno II	Biometra
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Polyacrylamidgelkammer (42 cm × 39 cm)	Biometra
Schüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik
Sequenziergelapparatur	Bio-Rad
Speed Vac SC 110-A	Faust
Spektrophotometer DU 650	Beckman
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
TRIO-Thermoblock	Biometra
Typhoon 8600 Variable Mode Imager	GE Healthcare
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103 H	Bandelin
Vortex Genie 2	Bender & Hobein
Zentrifuge Sorvall RC-5B mit Rotor GS-3 und SS-34	Sorvall
Zentrifuge Hettich Rotixa 120R	Hettich
Zentrifuge Beckman Avanti J-25 mit Rotor JA-25.50 und JLA-10.500	Beckman

2.5 Bakterienstämme

E.coli-Stamm BL21 (DE3)

Genotyp: $F^- ompT hsdSb (r_B^- m_B^-) gal dcm rne 131$ (DE3)

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

E.coli-Stamm M15

Genotyp: $Nal^S Str^S Rif^S lac ara gal mtl recA^-$

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

E.coli-Stamm XL1 *blue*

Genotyp: $recA1 endA1 gyrA96 thi-l hsdR17 supE44 relA1 lac$

Herkunft: MPI f. molekulare Physiologie, Dortmund

2.6 Plasmide

pRT1 66/51.1

Eigenschaften: Amp^r, gegenläufige Koexpression von HIV-1 RT p66 und p51

Vektor: pKK 233-2 (GE Healthcare)

Herkunft: MPI f. med. Forschung, Abt. Biophysik, Heidelberg [103]

pHRT51

Eigenschaften: Amp^r, Expression von HIV-1 RT p51 mit 6xHIS-Etikett (Isolat HXB2)

Vektor: pdS56RBSII

Herkunft: Stuart Le Grice, National Cancer Institute, NCI-Frederick

pACYC177-T7-Luc

Eigenschaften: Amp^r

Vektor: pACYC177 (New England Biolabs)

Herkunft: MPI f. molekulare Physiologie, Abt. Physikalische Biochemie, Dortmund

pGEX-4T-1 TEV

Eigenschaften: Amp^r, Expression des N-terminalen GST-Fusionsproteins

Vektor: pGEX-4T-1

Herkunft: MPI f. molekulare Physiologie, Abt. Physikalische Biochemie, Dortmund

pDMI.1

Eigenschaften: Kan^r, lac I^Q-Repressor

Herkunft: MPI f. med. Forschung, Abt. Biophysik, Heidelberg [20]

2.7 Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien

LB-Medium, pH 7,4	1 % (w/v)	Bacto-Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	1 % (w/v)	NaCl

2 TY, pH 7,3	1,6 %	Trypton
	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
	1 % (v/v)	Glyzerin
	1 mM	MgCl ₂
	50 mM	NaPO ₄

Für Agarplatten wurde das Flüssigmedium zusätzlich mit 15 g/l Agarose-Agar versetzt.

2.8 Enzyme und Größenstandards

<i>Ampli-Taq</i> Gold DNA-Polymerase	Roche
alkalische Phosphatase	New England Biolabs
DNase I	Roche
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fermentas
Proteinstandard für die Gelfiltration	Bio-Rad
Pyrophosphatase	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs
1 kb Standard	Gibco-BRL
LMW-Standard	GE-Healthcare

2.9 Oligonukleotide

2.9.1 DNA-Oligonukleotide

HP Primer

5'- tet gct ctg aag aaa att cc

HP Template

5'- atc tgg cct tcc tac aaa gga agg cca ggg aat ttt ctt cag agc aga

Luci-Sal-back

5'- cgc ctg teg aca att tgg act ttc cgc cct tct t

Luci-Nco-2 fw

5'- gcg gac cat ggc aat gga aga cgc caa aaa cat a

GST-fw

5'- ggg ctg gca agc cac gtt tgg tg

GST-rv

5'- ccg gga gct gca tgt gtc aga gg

RT1t49

5'- atc cgc ctg att agc gat act cag aag gat aaa ctg tcc aga act tgg a

RT1t49 short

5'- atc cgc cga agg ata aac tgt cca gaac ttg ga

Flo1 Primer

5'- tcc ctg ttc ggg cgc cac

Flo1 Primer modifiziert

5'- FAM-tcc ctg ttc ggg cgc cac

Flo6

5'- tgt gga aaa tct cta gac gtg gcg ccc gaa cag gga

19mer Primer

5'- Cy5-ttg tcc ctg ttc ggg cgc c

cTAR

5'- R6G-5/6- ggt tcc ttg cta gcc aga gag ctc ccg ggc tcg acc tgg tct aac aag aga
gac c - DABCYL

52mer

5'- ttg tcc ctg ttc ggg cgc cat gca gag att aac cct ata gtg agt cgt att a

T7 Primer

5'- taa tac gac tca cta ta

Template FP 8.7

5'- ccg ggg aga cgt gac gct tgg gac gat ggg tcc gcg tgt ggt cct ata gtg agt cgt att a

Template FP 9.2

5'- ggg gcg gac att gat aag cag cga gtg aca ttc cct gtc acc tat agt gag tcg tat ta

Template FP 9.9

5'- ggc ggg ggg aaa ccg gat cta tgc gat aag cag ctg cac gcg gcc tat agt gag tcg tat ta

2.9.2 RNA-Oligonukleotide

Pseudoknoten

5'- GGG AGA UUC CGU UUU CAG UCG GGA AAA ACU GAA

35mer

5'- GGG UUA AUC UCU GCA UGG CGC CCG AAC AGG GAC AA

FP 8.7

5'- GGC CCC UCU GCU CAG CGA ACC CUG CUA CCC AGG CGC ACA CCA
GG

FP 9.2

5'- CCC CGC CUG UAA CUA UUC GUC GCU CAC GCU CAC UGU AAG GGA
CAG UGG

FP 9.9

5'- CCG CCC CCC UUU GGC CUA GAU ACU CUA UUC GUC GAC GUG CGC
CGG

35mer

5'- GGG UUA AUC UCU GCA UGG CGC CCG AAC AGG GAC AA

7.1

5'- GGG GAG ACG UCA CGC UUG GGA CGA UGG GUC CGC GUG UGG U

7.6

5'- CCG AAU AGA GAG UGC GCC UUG GGA CAA UGA GUC CGG CUG C

2.10 Peptide

Peptid		Hersteller/Referenz
P1	WWTEYWQA	E. Schweizer, ETH Zürich
P2	WTEYWQA	E. Schweizer, ETH Zürich
P3	TEYWQYATWI	E. Schweizer, ETH Zürich
P4	WWTEYWQYAT	E. Schweizer, ETH Zürich
P5	WTEYWQYAT	E. Schweizer, ETH Zürich
TR-1	WVPAHKGIGGN	A. Trampe, Universität Lübeck
TR-2	KGIGGNEQVCKLVS	A. Trampe, Universität Lübeck
ESP-leu	LTWIPE	E. Schweizer, ETH Zürich
ESP-ile	ITWIPE	E. Schweizer, ETH Zürich
ESP-ala	ATWIPE	E. Schweizer, ETH Zürich
ESP-val	VTWIPE	E. Schweizer, ETH Zürich
ESP-phe	FTWIPE	E. Schweizer, ETH Zürich

2.11 Proteine

Protein	Hersteller/Referenz
HIV-1 RT p51	P. Rothwell, MPI Dortmund
HIV-1 RT p51 ^{K331A} , p51 ^{N363A} , p51 ^{D364A}	diese Arbeit
HIV-1 RT p66	T. Restle
HIV-1 RT	diese Arbeit
HIV-1 RT ^{L74V}	R. Krebs, MPI Dortmund
HIV-1 RT ^{M184V}	R. Krebs, MPI Dortmund
HIV-1 RT ^{AZT}	R. Krebs, MPI Dortmund
HIV-1 RT ^{AZT/M184V}	R. Krebs, MPI Dortmund
HIV-1 RT ^{W24G} , RT ^{F61G} , RT ^{W24G/F61G}	J. Depollier, CNRS Montpellier
HIV-1 RT p51 ^{W24G/F61G} /p66	J. Depollier, CNRS Montpellier
HIV-1 RT p51/p66 ^{W24G} , p51/p66 ^{W24G/F61G} , p51/p66 ^{F61G}	J. Depollier, CNRS Montpellier
HIV-1 RT p51[6H]/p66 ^{K287C[A448]}	P. Rothwell, MPI Dortmund
HIV-2 RT	T. Restle
T7 RNA-Polymerase	T. Restle
Klenow-Fragment	J. Cramer, MPI Dortmund
EIAV RT	M. Souquet, MPI Dortmund
GST-Luziferase	diese Arbeit
Nucleocapsid	Y. Mély, Universite Louis Pasteur Straßburg, Frankreich J.-L. Darlix, INSERM-ENS Lyon, Frankreich

Die verwendeten Plasmide kodierten für das RT-Gen aus dem HIV-1 Isolat BH10 [111, 59]. Die HIV-2 RT wurde aus dem Isolat D194 kloniert. Die verwendete EIAV-RT stammt vom Isolat 1369 ab. Alle verwendeten p51-Proteine waren an ihrem N-Terminus mit einem Polyhistidin-Etikett ausgestattet und entsprachen der Sequenz des Isolates HXB2.

2.12 Radioaktiv markierte Nukleotide

[γ -³²P]-ATP, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml Perkin Elmer

[³H]-TTP, 110 Ci/mmol, 2,5 mCi/ml Perkin Elmer

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Alle Messungen erfolgten in einer Quarzküvette in einem Beckmann Spektrophotometer. Folgende Relation wurde dabei zu Grunde gelegt:

$1 \text{ AU}_{260} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$ (gilt für doppelsträngige DNA).

In vielen Fällen war die Sequenz der Nukleinsäure (*in vitro* Transkripte, Oligonukleotide) bekannt, sodass der Extinktionskoeffizient zur Berechnung der Konzentration herangezogen werden konnte. Nach Messung der Absorption bei 260 nm wurde die Konzentration mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet.

3.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um nach enzymatischen Reaktionen Proteine aus wässrigen Lösungen zu entfernen, wurde die Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion gewählt. Die Lösung wurde mit einem Volumenteil eines 1:1 (v/v) Gemisches aus Phenol-Chloroform versetzt, gut durchmischt und zur Phasentrennung für 5 min bei 20 000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthält, wurde abgenommen und mit einem Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) versetzt, um die vorhandenen Phenol-Reste vollständig zu entfernen. Nach Zentrifugation (5 min, 20 000 g) wurde die wässrige Phase erneut abgenommen und konnte in weiterführende Reaktionen oder Fällungen eingeführt werden. Schloss sich eine Reaktion an, für die eine besonders saubere Nukleinsäurepräparation erforderlich war, wurden während der Phenol-Extraktion Phase Lock Gel-Reaktionsgefäße (Eppendorf) eingesetzt. In diesen Reaktionsgefäßen liegt eine gallertartige Substanz vor, die sich bei Zentrifugation zwischen die organische und wässrige Phase schiebt und somit ein sauberes Abnehmen der wässrigen Phase ermöglicht.

3.1.3 Fällung von Nukleinsäuren

3.1.3.1 Natriumacetat/Ethanol-Fällung

Sollten Nukleinsäuren gereinigt oder konzentriert werden, wurden sie mit Salz und Ethanol gefällt. Die Nukleinsäurelösung wurde mit 0,3 M Natriumacetat versetzt, gemischt und anschließend wurden drei Volumenteile eiskalten Ethanols (96 %) zugegeben. Die Mischung wurde für 30 Minuten bei -20°C inkubiert und die Nukleinsäuren anschließend bei 20 000 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Je nach Anwendung wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

3.1.3.2 Isopropanol-Fällung

Sollten RNAs gefällt werden, wurde die Lösung mit 0,4 M Lithiumchlorid und einem Volumenteil Isopropanol (96 %, eiskalt) versetzt. Das Gemisch wurde für 30 min bei -80°C inkubiert und bei 4°C für 30 min zentrifugiert (20 000 g). Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen und anschließend getrocknet. Je nach Anwendung wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

3.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

Molekularbiologische Grundtechniken wie der Verdau von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten, Ligation von DNA-Fragmenten, gelelektrophoretische Trennung und Anfärbung von Nukleinsäuren erfolgten nach Standardprotokollen [131].

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick-Gel-Extraction-Kit verwendet. Nach Elektrophorese in Anwesenheit von Ethidiumbromid wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht bei 320 nm identifiziert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte nach Herstellerangaben.

3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe der PCR wurden DNA-Fragmente aus Plasmid-DNA amplifiziert. Für analytische Zwecke wurde die *Taq* DNA-Polymerase, für Klonierungen die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet. Als Matrize dienten 25 ng Plasmid-DNA, zu der je 1 µM Primer, 200 µM des jeweiligen dNTPs und 2,5 U Polymerase mit entsprechendem Puffer zugegeben wurden. Die Temperaturprofile richteten sich nach den Primer-Eigenschaften und den Vorgaben des Polymerase-Herstellers. Normalerweise wurden 25–35 Reaktionszyklen mithilfe des

PCR-Geräts Uno II (Biometra) durchgeführt.

Zur Verifizierung der Insertion des richtigen DNA-Fragments nach einer Klonierung wurde eine PCR-Reaktion mit jeweils einem Fragment-spezifischen und einem Vektor-spezifischen Primer durchgeführt. Als Matrize dienten die Nukleinsäuren der zu untersuchenden Bakterienkolonie. Die Sequenzanalyse wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

3.1.6 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen war zunächst die Herstellung elektrokompetenter Bakterien erforderlich. 1 Liter LB-Medium wurde mit einer ü.N.-Kultur des entsprechenden Bakterienstammes angeimpft ($OD_{600}=0,06$) und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4500 g sedimentiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das Bakterienpellet wurde in 450 ml 5%igem eiskaltem Glycerin resuspendiert und erneut sedimentiert (wie oben beschrieben). Dieser Schritt wurde zunächst mit 300 ml 5%igem Glycerin und anschließend mit 50 ml 5%igem Glycerin wiederholt, um den Salzgehalt schrittweise zu verringern. Die kompetenten Zellen wurden zur Lagerung bei -80°C in 5 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und in 80 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.1.7 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation von Plasmid-DNA

80 µl elektrokompetente Zellen wurden mit 100 ng Plasmid versetzt und für 1 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienlösung wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und in einer Elektroporationsapparatur (Gene Amp II, Bio-Rad) einem Spannungspuls von 1500 V für 5 ms ausgesetzt. Die Zellen wurden umgehend mit 1 ml LB-Medium gemischt und für 1 h bei 37°C kultiviert. Die Bakterienzellen wurden sedimentiert (2 min, 4000 g), das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und nach 1:10 bzw. 1:100 Verdünnung in LB-Medium auf LB-Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum versetzt) ausgestrichen. Nach 12–16 h Wachstum bei 37°C wurden Kolonien zur weiteren Kultivierung selektiert.

3.1.8 Isolation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde entweder nach der Methode der alkalischen Lyse [13] oder mithilfe des QIAspin Miniprep Kits isoliert. Zur Präparation größerer Mengen (50–100 ml

Kulturen) wurde der Midi-Präp-Kit der Firma Qiagen benutzt.

3.1.9 Glyzerinkulturen von Bakterien

300 μl einer autoklavierten 50 %igen Glyzerinlösung wurden mit 700 μl der Bakterienlösung ($\text{OD}_{600} = 0,7$) gemischt, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.2.1.1 Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung bei 280 nm

Basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz wurde zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen die Absorptionsspektroskopie eingesetzt. Die Proteinlösung wurde in einem denaturierenden Messpuffer verdünnt, in eine Quarzküvette überführt und die Absorption bei 280 nm gemessen. Die Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Proteine wurden anhand ihrer Sequenz mit dem Programm *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server* (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) ermittelt. Die für die einzelnen Proteine ermittelten Extinktionskoeffizienten in Verbindung mit dem zugehörigen Aufreinigungsprotokoll sind im Abschnitt 3.2.6–3.2.9 angegeben.

Messpuffer

Guanidinium Hydrochlorid 6 M
Natriumphosphat, pH 6,5 20 mM

3.2.1.2 Konzentrationsbestimmung nach Ehresmann

Die Konzentration von Peptiden, die kein Tryptophan zur Konzentrationsbestimmung aufwiesen, wurden nach der Methode von Ehresmann bestimmt [41]. Hierzu wurde die Absorption bei 228,5 nm und 234,5 nm gemessen und die Konzentration wurde über folgenden Zusammenhang berechnet:

$$\frac{A_{256\text{nm}} - A_{234\text{nm}}}{3,1} = c \text{ (mg/ml)}$$

3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Nachweis beruht auf der Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau von 465 nm auf 595 nm in Gegenwart von Proteinen [16]. Um die

Absorptionsänderung mit einer Proteinmenge zu korrelieren, wurde eine Kalibrierkurve mit definierten Mengen BSA (Rinderserumalbumin) verwendet. Mit dieser Methode können 0,2–2 μg Protein nachgewiesen werden. Zu 200 μl Probe wurden 800 μl Bradford-Reagenz gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

Bradford-Reagenz

Serva Blue G	100 mg
Phosphorsäure	100 ml
Ethanol	50 ml
H ₂ O	ad 1 l

3.2.2 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mithilfe von Ultrafiltrationseinheiten der Firma Millipore konzentriert. Dabei wurde für alle hier beschriebenen Proteine eine Porengröße von 30 000 Da gewählt. Sollte zudem ein Pufferaustausch stattfinden, wurde nach Einengen der Proteinlösung neuer Puffer hinzupipettiert und der Konzentrierungsprozess mehrmals wiederholt. Sollten kleine Volumina (10–200 μl) dialysiert werden, wurden Micro Dialyzer der Firma Spectrum (Breda, NL) verwendet.

3.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufzutrennen, wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli durchgeführt [84]. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert Proteine, sodass diese entfaltet werden und Komplexe in die einzelnen Untereinheiten zerfallen. Zusätzlich versieht SDS die Proteine mit einer negativen Ladung, da es sich an die Proteine anlagert und deren Eigenladung effektiv überdeckt. Die vertikalen Gele (Hofer, Mighty Small System) bestanden aus einem 5 % igem Sammelgel und einem 10, 12 oder 15 % igem Trenngel. Die Laufstrecke betrug 9 cm, wobei 2/3 der Strecke das Trenngel ausmachte. Die Dicke der Gele betrug 0,75 mm. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Auftragspuffer versehen und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese fand in 1 x Laemmli-Puffer für etwa 45 Minuten bei 40 W statt.

	Sammelgel		Trenngel	
	5 %	10 %	12 %	15 %
PAA (Vernetzungsgrad 37,5:1)	0,5 ml	1,7 ml	2 ml	2,5 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	—	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
1 M Tris/HCl, pH 6,8	0,38 ml	—	—	—
10 % SDS	30 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
H ₂ O ad	3 ml	5 ml	5 ml	5 ml
TEMED	3 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
10 % APS	30 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l

Laemmli-Auftragspuffer (2 \times)

Tris/HCl, pH 6,8	125 mM
SDS	4 %
Glyzerin	20 %
DTT	200 mM
Bromphenolblau	0,02 %

3.2.4 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Um Proteine im Polyacrylamidgel nachzuweisen, wurde das Gel für 30 bis 60 Minuten unter Schwenken in einer Färbelösung (50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Ethanol, 0,25 % (w/v) Serva Blue R) inkubiert. Zur Verminderung des Hintergrundes wurde das Gel nachfolgend mehrere Stunden in Entfärber (50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure) geschwenkt.

3.2.5 Expression von Proteinen

Proteine wurden standardmäßig in Schüttelkulturen exprimiert. Je nach Protein wurden 2–6l einer Hauptkultur angezogen. Die Hauptkultur wurde mit der über Nacht angezogenen Vorkultur angeimpft, sodass eine optische Dichte von 0,1 erreicht wurde. Die Bakterien wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 mit 0,4 mM IPTG induziert, für mindestens 4 h kultiviert und anschließend durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 5 000 g geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -80 °C gelagert bzw. sofort verarbeitet. Die detaillierten Daten zur Expression der jeweiligen Proteine sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Protein	T_V (°C)	V_H (l)	T_H (°C)	OD_I	IPTG (mM)	t_E (h)
HIV-1 RT	37	6	37	0,8	0,4	4
HIV-1 RT / p51 UE	37	6	37	1,0	0,4	4
Luziferase	25	2	25	0,8	0,4	4

T_V : Inkubationstemperatur der Vorkultur

V_H : Hauptkulturvolumen

T_H : Inkubationstemperatur der Hauptkultur

OD_I : Optische Dichte (gemessen bei 600 nm) zum Zeitpunkt der Induktion

IPTG: Endkonzentration an IPTG zum Zeitpunkt der Induktion

t_E : Expressionsdauer

3.2.6 Reinigung der HIV-1 Reversen Transkriptase

3.2.6.1 Puffer

Lysepuffer 25 mM Tris/HCl pH 8,0
 5 mM DTT
 1 mM EDTA
 0,4 mM PMSF

Puffer A 50 mM Tris/HCl pH 8,0
 25 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 6 % Glyzerin

Puffer B 50 mM Tris/HCl pH 8,0
 1 M NaCl
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 6 % Glyzerin

Gelfiltrationspuffer 10 mM Bis-Tris-Propan/HCl pH 7,0
 250 mM Ammoniumsulfat

Lagerpuffer 20 mM Tris/HCl pH 7,8
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 10 % Glyzerin

3.2.6.2 Zellaufschluss

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden in 3 ml/g Zellmasse Lysepuffer resuspendiert und nach Resuspension für weitere 20 Minuten auf Eis gerührt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einem Mikrofluidizer (Microfluidics Corporation Newton, Massachusetts). Über die auftretenden Scherkräfte werden die Zellen zerstört. Um die bakterielle DNA zu fragmentieren, wurde die Lösung zusätzlich mit Ultraschall behandelt (konstante Beschallung für 7×20 Sekunden, 80 % output control, Branson). Bei der sich anschließenden Zentrifugation (45 min, 27 000 g, 4°C) wurden die unlöslichen Bestandteile pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Dauer des zweiten Aufschlusses bei 4°C gelagert. Das Pellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und die NaCl-Konzentration auf 1 M eingestellt. Es folgte eine erneute Ultraschallbehandlung mit anschließender Zentrifugation. Der resultierende Überstand wurde mit dem zuvor gewonnenen Überstand vereinigt.

3.2.6.3 Erste Ammoniumsulfatfällung

Der so gewonnene Rohextrakt wurde einer ersten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Dafür wurde der Überstand unter Rühren schrittweise mit Ammoniumsulfat versetzt bis eine Endsättigung von 60 % erreicht wurde. Nach Zugabe des Salzes wurde die Lösung für weitere 30 Minuten auf Eis gerührt. Das präzipitierte Protein wurde über eine Zentrifugation (27 000 g, 40 min, 4°C) vom löslichen Überstand getrennt. Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen Puffer A resuspendiert (3 ml/g Ausgangszellen).

3.2.6.4 Nukleinsäure-Fällung

Der Zusatz von 40 mg/ml Streptomyzinsulfat zum Überstand aus 3.2.6.3 ermöglichte das Ausfällen von Nukleinsäuren. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (40 min, 27 000 g, 4°C). Der Überstand wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt (Ausschlussgröße: 12 000 - 14 000 Da) und gegen 2l Puffer A für 4 Stunden dialysiert, der Puffer gewechselt und nochmals über Nacht dialysiert. Ausgefallene Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen abgetrennt.

3.2.6.5 DEAE-Säule

Über eine Peristaltikpumpe wurde Dialysat (3.2.6.4) auf eine mit Puffer A voräquilibrierte DEAE-Säule geleitet. Da die RT mit einem pI von 9,3 unter den gewählten Bedingungen positiv geladen ist, befindet sie sich im Ausschlussvolumen, während ca.

90 % der bakteriellen Proteine an das Säulenmaterial binden. Der Durchfluss wurde in Fraktionen gesammelt. Über eine SDS-PAGE wurden die RT-haltigen Fraktionen identifiziert.

3.2.6.6 Heparin-Säule

Die vereinigten RT-haltigen Fraktionen (3.2.6.5) wurden auf eine mit Puffer A äquilibrierte Heparinsäule appliziert (1 ml/min). Die Säule wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min mit Puffer A gewaschen bis die Absorption bei 280 nm wieder ihren Ausgangswert erreicht hatte. Die Elution des Proteins erfolgte über einen linearen Salzgradienten von 25 mM–1 M NaCl. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und auf einem SDS-PAGE auf RT-Gehalt getestet.

3.2.6.7 Zweite Ammoniumsulfatfällung

Das vereinigte Eluat der Heparinsäule (3.2.6.6) wurde einer zweiten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Die Bedingungen wurden wie unter 3.2.6.3 beschrieben gewählt.

3.2.6.8 Gelfiltration

Im letzten Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltrationssäule benutzt (HiLoad 26/60). Dazu wurde das in 3.2.6.7 beschriebene Proteinpellet in 1–2 ml Gelfiltrationspuffer gelöst und über eine Probenaufgabeschleife auf die Säule aufgetragen. Bei einer Flussrate von 2 ml/min wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt, die anschließend auf einem SDS-PAGE überprüft wurden. Die ausgewählten Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und das Protein in Lagerpuffer überführt (3.2.2). Die Proteinkonzentration wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt (Extinktionskoeffizient $260\,450\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.2.7 Reinigung der p51 Untereinheit der HIV-1 Reversen Transkriptase

3.2.7.1 Puffer

W[Ni]	100 mM	Tris/HCl pH 8,0
RT-D-10	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
	200 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	10 %	Glyzerin

RT-D-15	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
	25 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	15 %	Glyzerin

3.2.7.2 Zellaufschluss

Alle Schritte während der Aufarbeitung wurden bei 4°C durchgeführt. Die pelletierten Zellen wurden in 2 ml eiskaltem Puffer W[Ni] + 1 M NaCl pro Gramm Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden mit einem Mikrofluidizer bei 650 psi aufgebrochen. Zusätzlich wurde die Lösung mit Ultraschall behandelt, um die DNA im Zelllysat zu degradieren. Anschließend wurde das Lysat bei 46 000 g für 45 Minuten zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und der weiteren Aufarbeitung unterzogen.

3.2.7.3 Ni-NTA-Säule

Am N-Terminus des rekombinanten p51-Proteins befand sich eine Polyhistidin-Sequenz, die unter spezifischen Bedingungen an Ni-NTA-Material bindet. Hier wurde eine Ni-NTA-Säule verwendet (Qiagen, Hilden), die zuvor mit Puffer W[Ni] + 1 M NaCl äquilibriert wurde. Der in 3.2.7.2 beschriebene Überstand wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Aufschlusspuffer gewaschen bis die Absorption bei 280 nm ihren Ausgangswert erreicht hatte. Schwach gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Puffer W[Ni] + 5 mM Imidazol von der Säule entfernt. Ein Imidazolgradient von 0–500 mM in Puffer W[Ni] über 100 Minuten führte zur Elution der p51 Untereinheit (Flussrate 1 ml/min). Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Nach Analyse auf einem SDS-Gel wurden die p51-haltigen Fraktionen vereinigt. Die Proteinlösung wurde mit einem gleichen Volumen an Puffer RT-D-10 versetzt und für 16 h gegen RT-D-10 dialysiert.

3.2.7.4 DEAE / Hi-Trap SP Säule

Das Dialysat wurde anschließend mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine voräquilibrierte Ionenaustauscherkombination aus einer DEAE-Säule in Serie mit einer Hi-Trap SP Säule geladen. Die Säulen wurden mit 150 ml RT-D-10 gewaschen. Die DEAE-Säule wurde entfernt und das Protein mit einem NaCl-Gradienten von der Hi-Trap SP Säule eluiert. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und die Anwesenheit des Proteins erneut auf einem SDS-Gel überprüft. Die Fraktionen, die die p51-Untereinheiten enthielten, wurden vereinigt, konzentriert (3.2.1.1) und der Puffer gegen RT-D-15 ausgetauscht

(3.2.2). Die Proteinkonzentration wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt (Extinktionskoeffizient $124\,180\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.2.8 Reinigung der firefly Luziferase

3.2.8.1 Puffer

Aufschlusspuffer	137 mM	NaCl
	2,68 mM	KCl
	4,3 mM	NaH ₂ PO ₄
	1,47 mM	KH ₂ PO ₄
	0,4 mM	PMSF
Elutionspuffer	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	Glutathion
Puffer A	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
Puffer B	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 M	NaCl
Gelfiltrationspuffer	10 mM	Bis-Tris-Propan/HCl pH 7,0
	250 mM	Ammoniumsulfat
Lagerpuffer	25 mM	Tris/HCl pH 7,8
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	15 %	Glyzerin

3.2.8.2 Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde unter Rühren in 4,7 ml eiskaltem Aufschlusspuffer pro Gramm Zellmasse auf Eis resuspendiert. Anschließend wurde die Bakterienlösung für weitere 30 Minuten auf Eis gerührt. Der Aufschluss der Zellen wurde in zwei Schritten vollzogen. Zunächst wurde pro Milliliter Zelllösung 3 mg Lysozym (Sigma-Aldrich, 46 400 U/mg) zugesetzt. Unter Rühren wurde für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Darüber hinaus wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Dafür wurden 7–10 Beschallungen für 20 Sekunden vorgenommen (80 % duty cycle, Branson). Die Lösung wurde währenddessen auf Eis gehalten, um eine Erwärmung zu verhindern. Die Zellmembranen und unlöslichen Zellbestandteile wurden durch eine Zentrifugation für 60 Minuten bei 15 000 g und 4 °C vom löslichen Zellextrakt getrennt.

3.2.8.3 Glutathion-Säule

Da die rekombinante Luziferase mit einem Glutathion-S-Transferase-Etikett am N-Terminus ausgestattet war, konnte die Methode der Affinitätschromatographie im ersten Schritt der Aufreinigung verwendet werden. Der in 3.2.8.2 beschriebene Überstand wurde auf eine mit PBS äquilibrierte Glutathionsäule geleitet (Glutathion-Sepharose 4B, GE Healthcare, 10 ml; Flussrate 0,2 ml/min). Schwach gebundene und kontaminierende Proteine wurden mit PBS von der Säule gewaschen bis die Absorption bei 280 nm wieder den Ausgangswert erreicht hatte. Anschließend wurde die rekombinante Luziferase mit 15 ml Elutionspuffer eluiert. Die proteinhaltige Elutionslösung wurde gesammelt.

3.2.8.4 Ionenaustauschersäule

Das Eluat der Glutathionsäule wurde mithilfe einer Peristaltikpumpe auf eine Anionenaustauschersäule gepumpt (30 ml Resource Q15, GE Healthcare), die zuvor mit Puffer A äquilibriert wurde. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen Puffer A gespült bis die Absorption wieder den Ausgangswert erreicht hatte. Anschließend wurde die Säule an eine FPLC-Anlage (Waters 550E) angeschlossen und das Protein mithilfe eines Salzgradienten von 0–1 M NaCl in 20 Säulenvolumina eluiert. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt. Fraktionen, die aktive Luziferase enthielten, wurden über eine SDS-PAGE und einen Luziferasetest identifiziert (siehe 3.4.7).

3.2.8.5 Gelfiltration

Damit ein möglichst kleines Volumen auf die Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60, GE Healthcare) appliziert werden konnte, wurden die vereinigten luziferasehaltigen Fraktionen (3.2.8.4) über eine Ultrafiltrationseinheit konzentriert (3.2.2). Das so erhaltene Konzentrat wurde über eine Probenschleife auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Das Eluat wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden über ein SDS-Gel identifiziert, vereinigt, anschließend konzentriert und anschließend ein Pufferaustausch durchgeführt, sodass das rekombinante Protein in Lagerpuffer vorlag (3.2.2). Das Protein wurde schockgefroren und konnte über mehrere Wochen bei -80 °C gelagert werden.

3.2.9 Lösen des Nucleocapsid-Proteins

Verschiedene Varianten des Nucleocapsid-Proteins (AS 1-52, AS 12-52 und AS 1-71) wurden freundlicherweise von Y. Mély, Straßburg und J.L. Darlix, Lyon zur Verfügung gestellt und wurde in lyophilisierter Form übersandt. Daher musste das Protein zunächst

gelöst und eine Oxidation der zur Ausbildung der Zinkfinger essentiellen Cysteine verhindert werden.

Das Lyophilisat (1–2 mg) wurde in 200–400 μl Wasser (filtriert und entgast) gelöst. Der pH-Wert der Lösung liegt ungefähr bei 3, sodass die SH-Gruppen des Proteins reduziert vorliegen. Anschließend wurde die Lösung verdünnt und die Konzentration des Proteins spektralphotometrisch bestimmt (siehe 3.2.1.1, Extinktionskoeffizient $5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die Proteinlösung wurde mit 3 Äquivalenten Zinksulfat versetzt und der pH mit HEPES (Endkonzentration von 50 mM) auf pH 7,5 eingestellt. Nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff konnten die Proteinaliquots über mehrere Wochen bei -80°C gelagert werden.

3.2.10 Test auf RNase-Kontamination

Die in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Bindungsstudien erforderten RNase-freie Bedingungen. Um dies zu gewährleisten wurden die Proteinpräparationen einem RNase-Test unterzogen. Eine radioaktiv markierte RNA wurde zusammen mit dem zu testenden Protein für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA über ein analytisches Harnstoffgel aufgetrennt und das Ausmaß der RNA-Degradation analysiert.

3.3 Nukleinsäuren

3.3.1 Transkription

Für RT-Bindungsstudien wurden unterschiedliche *in vitro* Transkripte benötigt. Als DNA-Matrize für die *in vitro* Transkription wurden Oligonukleotide genutzt (siehe Kapitel 2.9), an deren 3'-Ende ein Oligonukleotid hybridisiert wurde, das den T7-Promotorsequenz enthielt. Dadurch war es möglich, die entsprechenden Sequenzen mit der T7-RNA-Polymerase zu transkribieren. Alle eingesetzten Chemikalien und Enzyme waren frei von RNasen. Die Transkriptionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Transkriptionsansatz		10x Transkriptionspuffer	
10× Transkriptionspuffer	100 μl	Tris/HCl, pH 8,0	400 mM
rNTP (100 mM)	je 20 μl	Spermidin	10 mM
dsDNA	500 nM	DTT	50 mM
RNasin (40 000 U/ml)	3 μl	BSA	500 $\mu\text{g/ml}$
Pyrophosphatase (2 000 U/ml)	0,5 μl	MgCl ₂	80 mM
T7 RNA-Polymerase (10 mg/ml)	10 μl		
H ₂ O	ad 1 ml		

Die T7 RNA-Polymerase wurde von Tobias Restle gereinigt und freundlicherweise zur

Verfügung gestellt. Der Ansatz wurde 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um die DNA-Matrize abzubauen. Dafür wurde der Ansatz mit 2 μ l CaCl₂ (2 M) und 2 μ l DNase I (10 000 U/ml) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l 0,5 M EDTA, pH 8,0 abgestoppt. Zur Entfernung der Proteinbestandteile wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform extrahiert (3.1.2) und darauf folgend mit LiCl und Isopropanol gefällt (3.1.3.2). Eine weitere Reinigung der Transkripte erfolgte über eine präparative PAGE mit anschließender Gelelution (3.3.4.3).

3.3.2 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Nukleinsäuren

Für enzymkinetische Messungen wie RNaseH-Aktivität und Polymerase-Aktivität der HIV-1 RT, für Einzelnukleotideinbaustudien, zum Nachweis von RNase-Verunreinigungen in Protein-Präparationen und zur Überprüfung von synthetischen und *in vitro* transkribierten RNAs war die radioaktive Markierung von Nukleinsäuren nötig.

Dephosphorylierungsansatz

10× CIP-Puffer	10 μ l
Oligonukleotid	2 nmol
CIP (10 000 U/ml)	2 μ l
H ₂ O	ad 100 μ l

In vitro Transkripte wurden zuvor dephosphoryliert, um die 5' Phosphatgruppe zu entfernen und ein freies 5'OH-Ende zu generieren. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C und anschließend zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70°C inkubiert. Proteine wurden über Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt (3.1.2) und die Nukleinsäuren gefällt (3.2.6.4).

Synthetisch hergestellte Nukleinsäuren verfügten aufgrund der Synthesestrategie bereits über ein freies 5'OH-Ende und konnten direkt phosphoryliert werden.

Phosphorylierungsansatz

10× PNK-Puffer	5 μ l
Oligonukleotid (dephosphoryliert)	500 pmol
T4-PNK (10 000 U/ μ l)	5 μ l
γ - ³² P-ATP (3000 Ci/mmol)	5 μ l
H ₂ O	ad 50 μ l

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren und die Nukleinsäuren zu extrahieren wurde der Ansatz anschließend einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen (vgl. 3.1.2). Der wässrige Überstand wurde nach Angaben

des Herstellers über eine Gelfiltrationssäule (G-25 Micro Column, GE Healthcare) von freiem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ getrennt. Da während der Reinigung ein geringer Verlust an Oligonukleotid auftreten kann, die Kenntnis der Konzentration der Nukleinsäure für enzymkinetische Messungen aber sehr wichtig ist, wurde zur Konzentrationsbestimmung und zur Überprüfung der Reinheit eine Analyse der Nukleinsäure per Dünnschichtchromatographie vorgenommen. Dafür wurde die Probe vor der Phenol/Chloroform-Extraktion 1:10 und nach der Reinigung 1:5 in Wasser verdünnt, auf eine DC-Platte (Polygram, CEL 300 PEI/UV254, Macherey & Nagel) pipettiert und getrocknet. Der DC-Lauf erfolgte in 0,6 M KH_2PO_4 , pH 3,5. Freies ATP wird hier von markierten Oligonukleotid getrennt. Die DC-Platte wurde getrocknet und für 5 min mit einer ^{32}P -sensitiven Platte exponiert, die mithilfe eines PhosphorImagers ausgelesen wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software ImageQuant (GE Healthcare). Aus dem integrierten Wert des Oligonukleotidsignals vor der Aufreinigung und der bekannten Menge an eingesetztem Oligonukleotid wurde die spezifische Aktivität berechnet. Zur Berechnung der jeweiligen Oligonukleotidkonzentration des Säuleneluats wurde das integrierte Signal zu der bereits ermittelten spezifischen Aktivität in Beziehung gesetzt und auf das genaue Volumen des jeweiligen Eluats bezogen. Die Ausbeute betrug in der Regel 60 bis 80 %.

3.3.3 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung von komplementären Nukleinsäuresträngen wurden die Oligonukleotide in einem molaren Verhältnis von 1:1 in Hybridisierungspuffer gemischt, 3 min auf 95 °C erhitzt und im Heizblock über einen Zeitraum von 1–2 h auf Raumtemperatur abgekühlt. Wurden Primer/Template-Gemische hybridisiert, sollte sicher gestellt werden, dass alle Primermoleküle hybridisiert waren. Daher wurde das Template im 1,2fachen Überschuss eingesetzt.

Hybridisierungspuffer

Tris/HCl, pH 7,8	20 mM
NaCl	50 mM

3.3.4 Gelelektrophorese

Für alle hier verwendeten Gelelektrophoresen wurde $1\times$ TBE als Laufpuffer verwendet. Sollten die Proben denaturiert werden, wurden sie in Formamid-Auftragspuffer (kurz Formamid-AP) aufgenommen. Wurden native Bedingungen gewählt, wurden die Proben mit Ficoll-Auftragspuffer vermischt.

TBE-Puffer (10×)		Formamid-AP		Ficoll-AP	
Tris	890 mM	Formamid	90 % (v/v)	Ficoll	20 % (v/v)
Borsäure	890 mM	EDTA	5 mM	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
EDTA	25 mM	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)	Xylencyanol	0,1 % (w/v)
		Xylencyanol	0,1 % (w/v)		

3.3.4.1 Analytische native Gelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese wurden zum Überprüfen von Hybridisierungsprodukten und zur Analyse von Protein/Nukleinsäure-Komplexen genutzt. Es wurde ein Gelsystem der Größe 11 cm × 12 cm × 1 mm verwendet. Die Gellösung bestand aus 8 %igem PAA in 1× TBE-Puffer und wurde durch Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED und 1 % (v/v) einer 10 %igen APS-Stammlösung polymerisiert. Um ein Erhitzen des Geles zu verhindern, wurden die Gelapparatur und die Puffer auf 4 °C vorgekühlt und auch der Vorlauf für 30 min bei 4 °C durchgeführt. Die Proben wurden 1:1 mit Ficoll-AP versetzt. Der Gellauf wurde für 1–3 h bei 4 °C und einer limitierten Leistung von 3 W durchgeführt. Mussten die Gele längerfristig aufbewahrt werden, wurden sie - wie unter 3.3.4.5 - beschrieben, immobilisiert. Die für diese Versuche verwendeten Nukleinsäuren waren entweder radioaktiv oder über ein Fluorophor markiert, sodass eine Auswertung über Autoradiographie oder über die Detektion der Fluoreszenz möglich war.

3.3.4.2 Analytische denaturierende Gelelektrophorese

Sollten Nukleinsäuren in hoher Ausflösung detektiert werden, wurden sie denaturierend in einem PAA-Gel mit 1× TBE-Puffer und 8 M Harnstoff elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach Länge der Nukleinsäure wurden Gele mit 10, 12 oder 15 % PAA-Gehalt verwendet. Die Gele hatten eine Größe von 40 cm × 21 cm × 0,4 mm. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED und 1 % (v/v) einer 10 %igen APS-Stammlösung zur Gellösung gestartet. Die Proben wurden in Formamid-AP aufgenommen und 3 Minuten bei 95 °C denaturiert. Um während der Gelelektrophorese denaturierende Bedingungen zu gewährleisten, wurde das Gel in einem 30-minütigen Vorlauf auf 50 °C erhitzt. Als Laufpuffer wurde entsprechend der Gelzusammensetzung 1× TBE-Puffer verwendet. Für diese Gelelektrophoresen wurde eine Gelkammer der Firma Bio-Rad verwendet. Zur Fixierung des Gels wurde es nach der elektrophoretischen Auftrennung in 10 %iger Essigsäure geschwenkt und anschließend auf Whatman GB 002 Blotting-Papier überführt. Das Gel wurde bei 80 °C für 1 bis 2 h getrocknet. Die für diese Versuche verwendeten Nukleinsäuren waren ausschließlich radioaktiv markiert, sodass eine Auswertung über Autoradiographie möglich war.

3.3.4.3 Präparative denaturierende Gelelektrophorese

Für die sich anschließenden Untersuchungen war es notwendig, die verwendeten *in vitro* Transkripte nach der Transkription aufzureinigen, da die T7-Polymerase häufig längere Transkripte produziert oder es je nach Transkript und Template verstärkt zu Abbrüchen kommen kann. Die *in vitro* Transkripte wurden denaturierend in einem 20 %igen PAA-Gel mit 1× TBE-Puffer und 8M Harnstoff bei einer limitierten Leistung von 17W elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde entsprechend der verwendeten Glasplatten in der Größe 20 cm × 17 cm × 1 mm gegossen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED und 1 % (v/v) einer 10 %igen APS-Stammlösung zur Gellösung gestartet. Die Transkripte wurden 1:1 in Formamid-AP aufgenommen und 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Um auch während der Gelelektrophorese denaturierende Bedingungen zu gewährleisten, wurde das Gel in einem 30-minütigen Vorlauf auf 50°C erhitzt. Als Laufpuffer wurde entsprechend der Gelzusammensetzung 1× TBE-Puffer verwendet.

3.3.4.4 Reinigung von Nukleinsäuren durch Gelelution

Um nicht radioaktiv markierte Nukleinsäuren aus einem Gel zu eluieren, wurde das präparative Gel (vgl. 3.3.4.3) zunächst auf eine DC-Platte (Polygram, CEL 300) gelegt. Die Nukleinsäuren konnten bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm detektiert werden. Der gewünschte Bereich wurde ausgeschnitten, in kleine Fragmente zerteilt und in eine Gelelutionskammer (Biotrap Elektrophoresekammer, Schleicher & Schuell) eingesetzt. Die Nukleinsäuren wandern nach Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung Kathode. Dabei passieren sie eine semipermeable Membran und werden von einer darauffolgenden impermeablen Membran aufgehalten. Zwischen beiden Membranen findet sich die konzentrierte Nukleinsäurelösung. Nach 4 Stunden Laufzeit bei 200 V wurde das Eluat entnommen und die Lösung über eine Nap 25-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) entsalzt. Anschließend wurde die Nukleinsäurelösung schockgefroren und lyophilisiert.

3.3.4.5 Elektrotransfer von Nukleinsäuren

Sollten native Gele über einen längeren Zeitraum exponiert oder gelagert werden, wurden die aufgetrennten Nukleinsäuren nach der Gelelektrophorese auf eine Membran transferiert. Die verwendete Nylon-Membran (Hybond-N, GE Healthcare) wurde vor Gebrauch für eine Minute in Wasser geschwenkt. Des Weiteren kamen sechs Lagen an Filterpapieren zum Einsatz (GB 003 Blotting Paper, Fa. Schleicher und Schuell), die vor dem Transfervorgang in 0,5× TBE eingelegt wurden. Der Transfer erfolgte nach der Semi-Dry-Methode mit einer Blotapparatur der Fa. GE Healthcare (SemiPhor). Die Blotein-

heit bestand ausgehend von der Anode aus drei Lagen Blottingpapier, der Membran, dem Gel und abschließend drei weiteren Lagen Blottingpapier. Der Transfer wurde für 10 Minuten bei 3 mA/cm^2 durchgeführt. Anschließend wurde die Membran getrocknet.

3.4 Enzymkinetische Methoden

Der Großteil der enzymkinetischen Methoden wurde mit der Reversen Transkriptase durchgeführt. Dafür wurde einheitlich, wenn nicht anders angegeben, der sogenannte RT-Assaypuffer eingesetzt.

RT-Assaypuffer

Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM

3.4.1 Untersuchungen zur Dimerisierung der Reversen Transkriptase

3.4.1.1 HPLC-Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration wurde eingesetzt, um Protein-Präparationen auf ihre Homogenität hin zu überprüfen und die Monomer/Dimer-Verteilung der HIV-1 RT zu analysieren. Die Proben wurden auf einer Superdex 200 HR 10/30 Säule (GE Healthcare) separiert und die Proteine über ihre Absorption bei 280 nm nachgewiesen. Wenn nicht anders angegeben wurde eine Flussrate von 0,5 ml/min benutzt. Der Laufpuffer setzte sich wie folgt zusammen:

Gelfiltrationspuffer	10 mM	Bis-Tris-Propan/HCl pH 7,0
	100 mM	Ammoniumsulfat

Zur Auswertung wurden die Flächen der einzelnen Peaks Mithilfe der Millenium-Software (Waters) integriert.

3.4.1.2 Assoziation der Reversen Transkriptase Untereinheiten

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob gezielte Punktmutationen in der p51 Untereinheit die Dimerisierung mit der p66 Untereinheit beeinflussen. In diesem Zusammenhang wurden Assoziationsexperimente durchgeführt. Die Untereinheiten wurden zunächst separat gereinigt (siehe 3.2.7, die p66 Präparation wurden freundlicherweise

von Dr. Tobias Restle zur Verfügung gestellt). Die p66 Untereinheit bildet in Abwesenheit von p51 stabile Homodimere aus. Daher wurde die zu verwendende Menge an p66 Protein zunächst 1:1 mit 30 % Acetonitril (ACN) versetzt, um die vorliegenden Homodimere zu dissoziieren [34]. Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 12 000 g bei 4 °C zentrifugiert, um eventuell ausgefallene Bestandteile abzutrennen. Die Monomerisierung wurde mithilfe der Gelfiltration überprüft.

Die auf diese Weise monomerisierte p66 Fraktion wurde in einem 100 μ l Ansatz mit der entsprechenden p51 Untereinheit bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Untereinheiten ergab sich jeweils eine Endkonzentration von 1,175 μ M. Der Assoziationspuffer enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl und 1 mM DTT. Nach 6, 24 und 146 Stunden wurde die Monomer/Dimer-Verteilung mithilfe der Gelfiltration analysiert.

3.4.1.3 Reassoziierung der Reversen Transkriptase Untereinheiten

Die in diesen Versuchen eingesetzte RT lag in 50 mM MES, pH 6,0 vor, da die Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln bei leicht saurem pH erniedrigt ist und eine vollständige Dissoziation mit Acetonitril erreicht werden kann [116]. Die RT-Lösung wurde zunächst auf eine Konzentration von 31,67 μ M mit 50 mM MES pH 6,0 verdünnt. Zur Dissoziation des RT Heterodimers wurde die Lösung mit 30 %igem Acetonitril versetzt, sodass eine Endkonzentration von 12 % ACN resultierte. Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 12 000 g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Monomerisierung des Dimers wurde mittels Gelfiltration überprüft. Die Reassoziierung der Untereinheiten wurde durch eine 1:15 Verdünnung der Proteinlösung in Acetonitril-freiem Puffer induziert. Die Ansätze wurden je nach Fragestellung bei Raumtemperatur oder 4 °C inkubiert. Es ergab sich eine Endkonzentration der RT von 1,27 μ M im Reassoziationsansatz. Der verwendete Reassoziationspuffer enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl. Je nach Experiment wurden dem Puffer mögliche Inhibitoren der Dimerisierung zugesetzt.

3.4.2 Filterbindungsassay

Sollten Bindungsaffinitäten zwischen Nukleinsäuren und Proteinen gemessen werden, kam u.a. der Filterbindungsassay zum Einsatz. Das Prinzip dieses Assays beruht auf einer nichtkovalenten Bindung von Proteinen an einen Nitrozellulosefilter. An das Protein gebundene und damit auf dem Filter verbleibende Nukleinsäuren können in einer späteren Szintillationszählung quantifiziert werden, nicht gebundene Nukleinsäuren werden zuvor gewaschen. Die Nitrozellulosefilter mussten für mindestens 16 Stunden im

entsprechenden Bindepuffer vorinkubiert werden, um die unspezifische Bindung von Nucleinsäuren zu minimieren.

Zunächst wurde die radioaktiv markierte Nucleinsäure (vgl. 3.3.2) mit steigenden Konzentrationen an Protein für 10 Minuten bei 25°C in Bindepuffer inkubiert. 10 µl des Ansatzes wurden auf einen Nitrozellulosefilter pipettiert, der auf einer Saugvorrichtung (Saugflasche mit Frittenaufsatz) aufgelegt war. Durch das angelegte Vakuum wurde die Flüssigkeit abgesaugt und der Filter mit 2 ml Puffer gewaschen. Die Filter wurden anschließend bei 60°C getrocknet und in ein Flüssigszintillationsgefäß überführt. Nach Einfüllen von 3 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität der Proben für 1 Minute in einem Flüssigszintillationszähler ausgezählt. Zusätzlich zu den eigentlichen Messwerten wurden zwei Kontrollwerte mitgeführt. Zum einen wurde ein Ansatz ohne Protein in gleicher Weise auf einen Filter pipettiert und gewaschen. Dieser Messwert gibt Auskunft über den Anteil der unspezifischen Bindung der Nucleinsäure an den Filter. Zum anderen sollte der maximal mögliche Messwert ermittelt werden, der später 100% gebundener Nucleinsäure entspricht. Dafür wurde 10 µl eines Ansatzes auf einen trockenen Filter pipettiert und ohne Waschen sofort zur Radioaktivitätsmessung eingesetzt.

Zur Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten wurde zunächst die prozentuale Menge an gebundener Nucleinsäure berechnet. Die so ermittelten Werte wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und mithilfe des Programms Grafit mit einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet.

3.4.3 Standard-Polymeraseassay

Der Standardassay wurde eingesetzt, um die Aktivität verschiedener RT-Präparationen zu überprüfen und um den konzentrationsabhängigen Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der Reversen Transkriptase zu bestimmen. Folgender Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert:

Reaktionsansatz		10x Assaypuffer	
10x Assaypuffer	2,5 µl	Tris/HCl pH 8,0	500 mM
22,7 µM ³ H-dTTP (110 Ci/mmol)	1,25 µl	KCl	800 mM
5 mM dTTP	0,25 µl	DTT	50 mM
poly(rA)/oligo(dT) ₁₅ [5 OD ₂₆₀ /ml]	1 µl	MgCl ₂	60 mM
H ₂ O	ad 25 µl		

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Enzyms. Von jedem Ansatz wurden 2x 10 µl auf ein 1cm x 2 cm großes DEAE-Filterpapier pipettiert. Die negativ geladenen Nucleinsäuren binden an die positiv geladenen DEAE-Seitenketten des Papiers, während

20× SSC

NaCl	3 M
Natriumcitrat pH 7,0	0,3 M

freie, nicht eingebaute Nukleotide in den folgenden Waschsritten entfernt werden. Die Filterpapiere wurden getrocknet und anschließend für 2× 5 Minuten mit 1× SSC und 1× mit 100 % Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Papiere für 30 Minuten bei 80 °C getrocknet. Anschließend wurden sie in Szintillationsgefäße überführt, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit für wässrige Lösungen überschichtet und gemessen. Für die Bestimmung der maximalen Aktivität wurden 10 μ l des Reaktionsansatzes auf ein Filterpapier gegeben, ohne Waschen getrocknet und ebenfalls vermessen.

3.4.4 RNaseH-Assay

Neben der Polymeraseaktivität wurde auch die RNaseH-Aktivität der RT getestet. Dazu wurde der Abbau eines radioaktiv markierten RNA-Stranges aus einem RNA/DNA-Hybrid verfolgt. Als RNA wurde ein 35-mer verwendet, als DNA ein 52-mer (Sequenzen sind in Abschnitt Material aufgeführt). Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz		10x Assaypuffer	
Assaypuffer	1×	Tris/HCl pH 8,0	500 mM
RT	20 nM	KCl	500 mM
RNA/DNA-Hybrid	133 nM	MgCl ₂	80 mM
		DTT	2 mM

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Hybrids gestartet und bei 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 10 μ l entnommen und 1:1 mit Formamid-AP gemischt, um die Reaktion zu stoppen. Die Proben wurden für 3 min bei 95 °C denaturiert und 3 μ l wurden in einem 12 %igen denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt (3.3.4.2). Das Gel wurde getrocknet und mit einer ³²P-sensitiven Platte exponiert. Die Intensität der 35 nt Bande wurde nach Autoradiographie mit dem Programm ImageQuant (Molecular Dynamics) ausgewertet. Die Abnahme des Substrats wurde gegen die Zeit aufgetragen und die Daten mit einer einfach exponentiellen Gleichung ausgewertet.

3.4.5 Charakterisierung des Nukleotideinbaus durch die Reverse Transkriptase

Eine detailliertere Analyse der HIV-RT Polymeraseaktivität wurde durch zeitaufgelöste Einzelnukleotideinbaustudien möglich, die ihrerseits in *pre-steady state* und *steady state* Kinetiken unterschieden werden können. In der *pre-steady state* Phase wird der Anfang einer Reaktion bis zur Einstellung des Fließgleichgewichtes (*steady state*) im Millisekundenbereich verfolgt. Die im Zusammenhang mit diesen Versuchen angegebenen Konzentrationen beziehen sich immer auf die finalen Konzentrationen im Reaktionsgemisch. Alle Experimente wurden bei 25 °C durchgeführt.

3.4.5.1 Untersuchung sehr schneller Einbaukinetiken

Der durch die HIV-RT vermittelte Nukleotideinbau in radioaktiv markierte Primer wurde mithilfe der Quench-Flow-Methode gemessen [69]. In dieser Arbeit wurde das Modell RQF-3 der Firma KinTek verwendet, das über ein Wasserbad temperiert werden konnte. Dieses Gerät erlaubt das schnelle Mischen zweier Lösungen und das kontrollierte Abstoppen der Reaktion nach definierten Zeitintervallen im Millisekundenbereich. In Abbildung 3.1 ist der schematische Aufbau einer Quench-Flow-Apparatur gezeigt. Die Probenschleife A wurde aus der Probenspritze A (gelb) mit einem vorgeformten Komplex aus RT und Primer/Template (p/t) befüllt. Wurde der Einfluss des NCs auf die Reaktion betrachtet, wurde nach Ausbildung des RT · p/t-Komplexes NC zugegeben und für 5 Minuten inkubiert. In der Probenschleife B (rot) befand sich die dNTP-Lösung. Diese enthielt das nächste, komplementär zum Template an das 3'-Ende des Primers einzubauende Nukleotid und war ggf. mit einem Kompetitor versetzt (p/t oder Pseudoknoten). Durch die Bewegung des Motors wird der Reaktionspuffer aus den Pufferspritzen in die Probenschleife geschossen und die Reaktionslösungen aus den Probenschleifen in die Reaktionsschleife gedrückt. Die Reaktionszeit ist hierbei abhängig von der Länge der Reaktionsschleife. Hat die Probe die Reaktionsschleife passiert, trifft sie auf die Quencherlösung (0,6 % TFA), die die Reaktion sofort abstoppt. Über die Ausgangsschleife wird die Probe dann in ein Auffanggefäß geleitet. Wurden kleine Reaktionsschleifen benutzt, musste die Volumendifferenz zur größten Schleife durch Zugabe von Quencherlösung ausgeglichen werden, um eine gleichmäßige Signalstärke für die spätere Analyse der Reaktionsprodukte zu gewährleisten. Der verwendete Primer war am 5'-Ende radioaktiv markiert, sodass der verlängerte vom unverlängerten Primer in einer denaturierendem Harnstoffgel getrennt und identifiziert werden konnte (3.3.4.2). 10 µl der aufgefangenen Reaktionslösung wurden 1:1 mit Formamid-Auftragspuffer vermischt, für 3 min bei 95 °C erhitzt und 3 µl auf ein 12 %iges Gel aufgetragen. Das getrocknete Gel wurde mit einer

^{32}P -sensitiven Platte exponiert, die in einem PhosphorImager eingelesen wurde. Die Signalstärke wurde mit dem Programm ImageQuant ausgewertet. Für jeden Messpunkt wurden die Signale des unverlängerten und des verlängerten Primers bestimmt, über den Hintergrund integriert und anschließend aus den ermittelten Werten der prozentuale Produktanteil berechnet. Zur Ermittlung des Nullwerts, der den Zeitpunkt $t=0$ angibt, wurden je $10\ \mu\text{l}$ der $\text{RT} \cdot \text{p}/t$ und der dNTP Reaktionslösung in $100\ \mu\text{l}$ Quenchlösung pipettiert. Der Nullwert wurde von allen ermittelten Produktanteilen abgezogen. Aus der eingesetzten Primerkonzentration konnte der Produktanteil in eine Konzentrationsangabe umgerechnet werden. Die Produktzunahme wurde in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ausgewertet. Die Berechnung der Polymerisationsraten erfolgte mit dem Programm Grafit unter Verwendung von exponentiellen Gleichung.

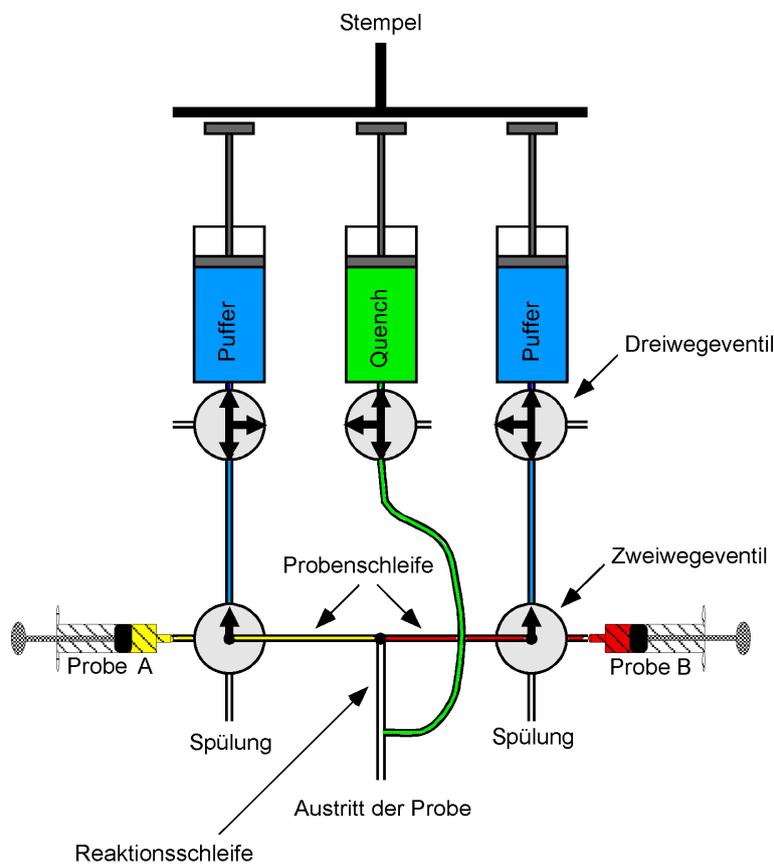


Abbildung 3.1: **Aufbau eines Quench-Flow Gerätes.**

3.4.5.2 Untersuchung langsamer Einbaukinetiken

Wurden Polymerisationsreaktionen im Sekundenbereich betrachtet, konnte die sogenannte Handquench-Methode eingesetzt werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Nukleotidlösung (25 μ l) zur RT · p/t-Lösung (25 μ l) gestartet. Nach den gewünschten Inkubationszeiten wurden 8 μ l des Reaktionsgemisches entnommen und die Reaktion durch Mischen mit 30 μ l 0,6 %ige TFA-Lösung gestoppt. Anschließend wurden 8 μ l dieser Lösung im Verhältnis 1:1 mit Formamid-Auftragspuffer versetzt und davon 3 μ l nach Erhitzen (95 °C für 3 Minuten) auf ein analytisches Harnstoffgel aufgetragen. Die weitere Handhabung und Auswertung erfolgte wie unter 3.4.5.1 beschrieben.

3.4.6 Fluoreszenzspektroskopische Methoden

Zur Analyse von Konformationsänderungen oder Bindungsgleichgewichten können oftmals Fluoreszenzuntersuchungen herangezogen werden, da sich die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der molekularen Umgebung des Fluorophors ändert. Bei Fluoreszenzmessungen wird zwischen intrinsischer und extrinsischer Fluoreszenz unterschieden. Intrinsische Fluoreszenz wird von biomoleküleigenen Fluorophoren emittiert (beispielsweise durch Tryptophane in Proteinen). Als extrinsisch wird die Fluoreszenz von Fluorophoren bezeichnet, die nicht natürlicher Bestandteil des Systems sind (in dieser Arbeit: FAM, Cy5, Alexa448, R6G). Intra- und intermolekulare Interaktionen können darüber hinaus über eine spezielle Variante der Fluoreszenzmessung, dem sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), verfolgt werden, bei dem zwei Fluorophore eingesetzt werden, zwischen denen eine Energieübertragung möglich ist.

Alle Fluoreszenzmessungen wurden am Fluoreszenzspektrometer Fluoromax III durchgeführt. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der Gerätesoftware DataMax 2.20 (Horiba Jobin Yvon).

Fluorophor	Excitation (nm)	Emission (nm)	Spalt (nm)	Ex/Em
Cy5	649	670		1/1
FAM	492	516		1/1
Alexa448	493	520		1/1
DABCYL	480	550		5/5

3.4.6.1 Gleichgewichts-Fluoreszenzmessungen

Um Dissoziationskonstanten zwischen RT und Nukleinsäureliganden zu bestimmen, wurden Fluoreszenztitrationen herangezogen. Interagiert die RT mit einem am Primer-

Molekül FAM-markierten p/t-Substrat, nimmt die Fluoreszenz des Fluorophors mit steigenden Mengen an hinzu titrierter RT ab. Im Fall der Verdrängungstitration wurde das FAM-p/t vollständig mit RT abgesättigt, sodass keine weitere Reduktion der FAM-Fluoreszenz erreicht werden konnte. Eine Titration eines um die Nukleinsäurebindungsstelle kompetitierenden RT-Bindungspartners führt bei steigenden Konzentrationen des Kompetitors zur Verdrängung des FAM-p/t. Der Prozess kann über die ansteigende Fluoreszenz des freigesetzten FAM-p/t verfolgt werden.

Die Messungen erfolgten in einer 700 μ l Quarzküvette (Hellma), mit 2 mm \times 10 mm Schichttiefe. Der Küvettenhalter wurde über ein Wasserbad auf 25 °C temperiert. Der verwendete RT-Reaktionspuffer wurde vor Gebrauch filtriert (0,2 μ m) und entgast. Die Fluoreszenzänderungen wurde bei jedem Titrationsschritt solange beobachtet, bis sich ein stabiles Signal einstellte. Die gemessenen Fluoreszenzwerte sowie die Konzentration der Liganden wurde im Anschluss korrigiert, um die Volumenzunahme während der Messung einzubeziehen. Die Daten wurden mit dem Programm Grafit (Fluoreszenztitration) bzw. Scientist (Verdrängungstitration) ausgewertet.

3.4.6.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Messungen (FRET)

Um die Dissoziation der Substrat-RT-Komplexe zu bestimmen, wurden FRET-Messungen durchgeführt. Dazu wurde eine Reverse Transkriptase verwendet, die in der p66 Untereinheit an Position 287 einen Aminosäureaustausch von Serin zu Cystein trug. Des Weiteren wurden alle anderen Cysteine in der p66 Untereinheit zu einem Serin mutiert. Damit wurde eine positionsspezifische Markierung über das eingeführte Cystein möglich. Die Markierung erfolgte mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Alexa⁴⁸⁸-C₅-Maleimid (Molecular Probes). Anschließend wurde die p66 mit der p51 Untereinheit versetzt, sodass das heterodimere Protein gewonnen werden konnte. Das so modifizierte Protein wurde freundlicherweise von Paul Rothwell zur Verfügung gestellt. Als Substrat kam ein Primer/Template zum Einsatz, das - verbunden über einen C₆-Aminolinker - am 5'-Ende des Primers ein Cy5-Fluoreszenzfarbstoff trug. Die Sequenz des Primer/Template-Substrats ist von der Sequenz der HIV-1 Primerbindungsstelle abgeleitet. Wie aus Proteinkristallstrukturen bekannt ist, befinden sich Donor- und Akzeptorfluorophor unter diesen Bedingungen im sogenannten Förster-Radius, der eine optimale Fluoreszenzübertragung von Donor zur Akzeptor zulässt [127].

Alle Messungen wurden in einer 70 μ l Fluoreszenzküvette (Hellma) bei 25 °C in RT-Assay-Puffer durchgeführt. Um das FRET-Signal zu verfolgen wurde eine Exitationswellenlänge von 492 nm (Spaltöffnung 1,0) und eine Emissionswellenlänge von 667 nm (Spaltöffnung 5,0) am Fluoromax III eingestellt. Die RT-Lösung wurde in die Küvette

überführt, anschließend das Primer/Template-Substrat zugegeben und das FRET-Signal bei 667 nm verfolgt. Nachdem sich ein stabiles Signal eingestellt hatte, wurden zügig 25 μM Pseudoknoten-RNA als Kompetitor in die Lösung gegeben, der nach Dissoziation des p/t die Nukleinsäurebindungsstelle der RT besetzt. Die Dissoziation des Primer/Templates konnte direkt über die Abnahme des FRET-Signals verfolgt werden. Sollte der Einfluss des Nucleocapsid-Proteins auf die Dissoziation bestimmt werden, wurde das Protein zum vorhandenen RT-p/t-Komplex zugegeben und vor Pseudoknotenzugabe ein stabiles Signal abgewartet. Nach jedem Schritt innerhalb des Experiments wurde ein Emissionsspektrum im Bereich von 450–750 nm aufgenommen, um die Veränderungen im Excitations- und Emissionsspektrum der Fluorophore zu verfolgen.

3.4.6.3 Test auf Chaperonaktivität des Nucleocapsid-Proteins

Das Nucleocapsid-Protein besitzt eine Nukleinsäure-Chaperon-Aktivität, die es ihm ermöglicht, doppelsträngige Nukleinsäureabschnitte zu entwinden. Um die Funktionalität des gelösten Proteins (3.2.9) in dieser Arbeit zu überprüfen, wurde die Chaperonaktivität bestimmt. Wie von Beltz *et al.* beschrieben [9], kann hierzu ein Oligonukleotid (cTAR) eingesetzt werden, das am 5'-Ende mit einem 6-Carboxyrhodamin (R6G) und am 3'-Ende mit einem DABCYL-Fluoreszenzlöcher ausgestattet ist. Das DNA-Oligonukleotid ist von der Sequenz des TAR-Strukturelements innerhalb der HIV-Genoms abgeleitet und bildet eine stabile Haarnadelschleife aus. Die Oligonukleotidtermini liegen in der energetisch stabilen Stamm-Struktur dicht beieinander, sodass die Fluoreszenz des angeregten R6G-Fluorophors durch DABCYL gequencht wird. Bei Zugabe des NCs wird die Stammstruktur gelöst, der Fluoreszenzlöcher räumlich vom Fluorophor getrennt und ein Anstieg der Fluoreszenz kann verzeichnet werden.

NC-Bindepuffer	25 mM	Tris/HCl pH 7,5
	30 mM	NaCl
	200 μM	MgCl ₂

Die Messungen wurden in einer 700 μl Quarzküvette (Hellma) durchgeführt. Zunächst wurde das DNA-Oligonukleotid cTAR in einer Konzentration von 100 nM in Bindepuffer vorgelegt. Nach Messen des R6G-Emissionsspektrum (500 bis 700 nm, Emissionsmaximum bei 550 nm) wurde NC zupipettiert, sodass ein molares Verhältnis von NC-Protein zu Nukleotid von 1:5 erreicht wurde. Die Lösung wurde gemischt und erneut das DABCYL-Emissionsspektrum aufgenommen. Für die aktive Form des NCs sollte der Quotient der ermittelten Fluoreszenzwerte der Emissionsmaxima bei 550 nm zwischen

6,5 und 7,5 liegen.

$$\frac{F_{+NC}}{F_{-NC}} = 6,5 - 7,5$$

Um das cTAR wieder in seine stabile Haarnadelstruktur zu überführen, wurde EDTA in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. EDTA chelatiert das für die NC-Aktivität essentiellen Zinkionen. Nach erneutem Mischen und Inkubation für 5 min sollte der Fluoreszenzwert des Emissionsmaximums den Wert vor der Zugabe des NCs erreichen.

3.4.7 Bestimmung der Luziferaseaktivität

Luziferase katalysiert die ATP-abhängige Oxidation des Substrats Luziferin. Dabei wird Licht emittiert (Lumineszenz). Die Quantifizierung der Lichtemission kann als Aktivitätsbestimmung für das Enzym herangezogen werden. Die Luziferaseaktivität wurde in einem Fluoroskan Ascent FL (Labsystems, Helsinki, Finnland) durchgeführt. Das Emissionssignal (relative light units, RLU) wurde über 90 Sekunden aufgenommen, wobei alle 10 Sekunden ein Messpunkt ermittelt wurde. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur in einer Mikrotiterplatte. Wenn nicht anders erwähnt wurden 5 μ l der Luziferaseprobe in 100 μ l Lumineszenzpuffer überführt und umgehend die Messung gestartet.

Lumineszenzpuffer	25 mM	Hepes, pH 7,5
	50 mM	KCl
	15 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT
	0,05 mg/ml	BSA
	240 mM	Coenzym A
	100 μ M	Luziferin
	1 mM	ATP

Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde folgendermaßen definiert: RLU nach 90 Sekunden pro μ g Gesamtprotein.

3.4.8 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Verschiedene Luziferase-Präparationen wurden vergleichend auf ihre ATPase-Aktivität hin überprüft. Ein 10 μ l Ansatz enthielt 1 μ l 10 \times Puffer 3 (500 mM Tris/HCl, pH 7,9, 1 M NaCl, 15 mM Mg₂Cl, 1 mM DTT), 33 fmol γ -[³²P]-ATP (Perkin Elmer) und die angegebenen Mengen an Luziferase. Als Kontrollen wurde Alkaline Phosphatase (CIP, Fa. NEB) und entsprechende Mengen an rekombinanter Luziferase (Promega) eingesetzt.

Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden 2 μ l jeder Probe auf eine DC-Platte aufgetragen (Polygram, CEL 300 PEI, Macherey & Nagel) und getrocknet. Der DC-Lauf erfolgte in 0,6 M KH_2PO_4 für 15 Minuten. Die Platte wurde getrocknet und für 15 Minuten mit einer ^{32}P -sensitiven Platte exponiert, die mit einem PhosphorImager (GE Healthcare) eingelesen wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software ImageQuant. Abgespaltenes und damit freies ^{32}P Phosphat fand sich an der Lösemittel-Lauffront, ungespaltenes ATP befand sich unter den gewählten Bedingungen am Auftragsort. Der integrierte Wert des freien ^{32}P Phosphat in der CIP-Kontrolle wurde auf 100 % ATPase-Aktivität gesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Proteinaufreinigung

4.1.1 Präparation der HIV-1 Reversen Transkriptase

Für alle Inhibitionsstudien und mechanistischen Untersuchungen mit der HIV-1 Reversen Transkriptase wurden größere Mengen an homogenem und RNase-freiem Protein benötigt.

Die in dieser Arbeit verwendete Reverse Transkriptase wurde nach einem bereits etablierten Protokoll aufgereinigt ([25], abgewandelt nach [103]). Nach Aufschluss der Zellen und einer ersten Ammoniumsulfatfällung wurden zunächst die Nukleinsäuren ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde dialysiert und die ausgefallenen Bestandteile durch eine erneute Zentrifugation abgetrennt.

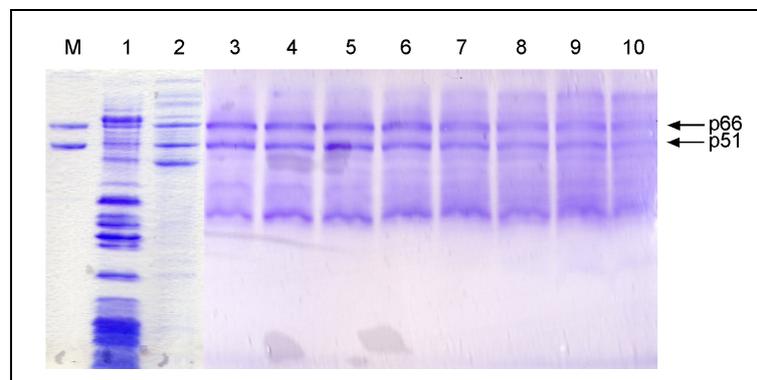


Abbildung 4.1: **Aufreinigung der HIV-1 Reversen Transkriptase über eine DEAE-Säule.** Die gesammelten Fraktionen wurden auf einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Coomassie-Blau gefärbt. Als Größenstandard wurde gereinigte HIV-1 RT eingesetzt: Spur M. Spur 1: Pellet nach Zentrifugation des Dialysats, Spur 2: Überstand nach Zentrifugation des Dialysats, Spur 3–10: Fraktionen.

Wie in Abbildung 4.1 zu erkennen ist, befand sich nur ein sehr geringer Teil des Proteins im Pellet (Spur 1). Der RT-haltige Überstand (Spur 2) wurde auf eine DEAE-Säule aufgetragen. Unter den gewählten Bedingungen lag die Reverse Transkriptase als positiv

geladenes Molekül vor und bindet im Gegensatz zu den meisten bakteriellen Proteinen nicht an die positiv geladene DEAE-Sepharose. Daher befindet sich das Protein im Durchfluss der Säule (Spur 3–10).

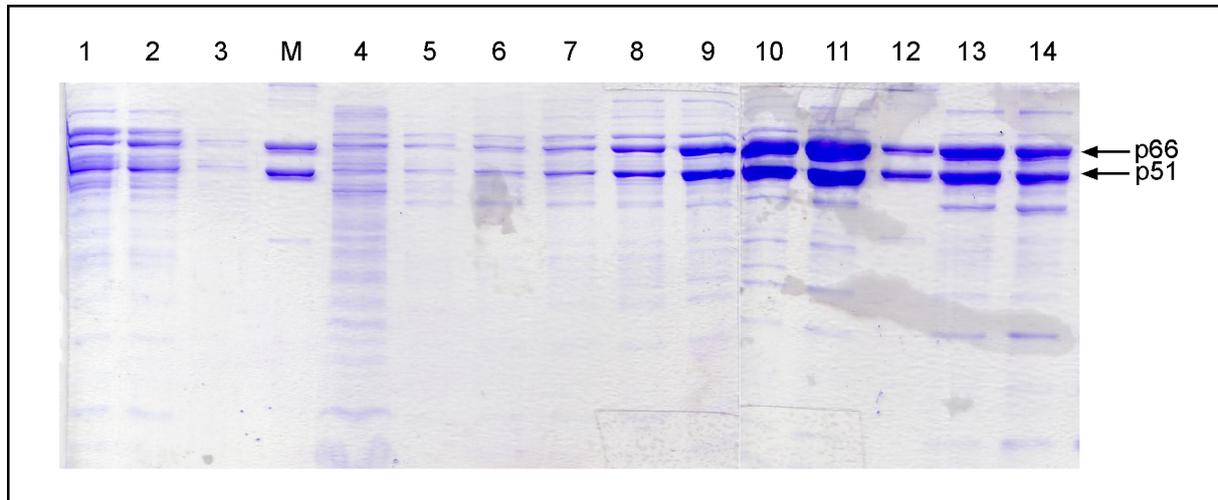


Abbildung 4.2: **Aufreinigung der HIV-1 Reversen Transkriptase über eine Heparin-Säule.** Das Protein wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Die aufgefangenen Fraktionen sind auf einem Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gel gezeigt. Spur M: HIV-1 RT Standard. Spur 1–14: Elutionsfraktionen.

Die Reverse Transkriptase weist eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren auf und wurde daher in einem zweiten Schritt an einer Heparinsäule gereinigt. Heparin ist ein Polyanion, an das Nukleinsäure-bindende Proteine wegen der Ähnlichkeit zum Phosphatrückgrat von Nukleinsäuren binden. Das Protein wurde über einen Salzgradienten eluiert. In Abbildung 4.2 sind die Fraktionen der Elution gezeigt. Die Reverse Transkriptase konnte hier bereits in einer über 70%igen Reinheit gewonnen werden.

Im letzten Schritt wurde das Protein über eine Größenausschlusschromatographiesäule gereinigt. Diese chromatographische Methode erlaubt die Trennung von Biomolekülen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Niedermolekulare Proteine, die durch die vorangegangenen Schritte nicht abgetrennt werden konnten, konnten über die Gelfiltration effizient isoliert werden. In Abbildung 4.3 ist die Analyse der einzelnen Fraktionen gezeigt. Die Ausbeute betrug 30 mg Protein pro 50 g Zellmasse.

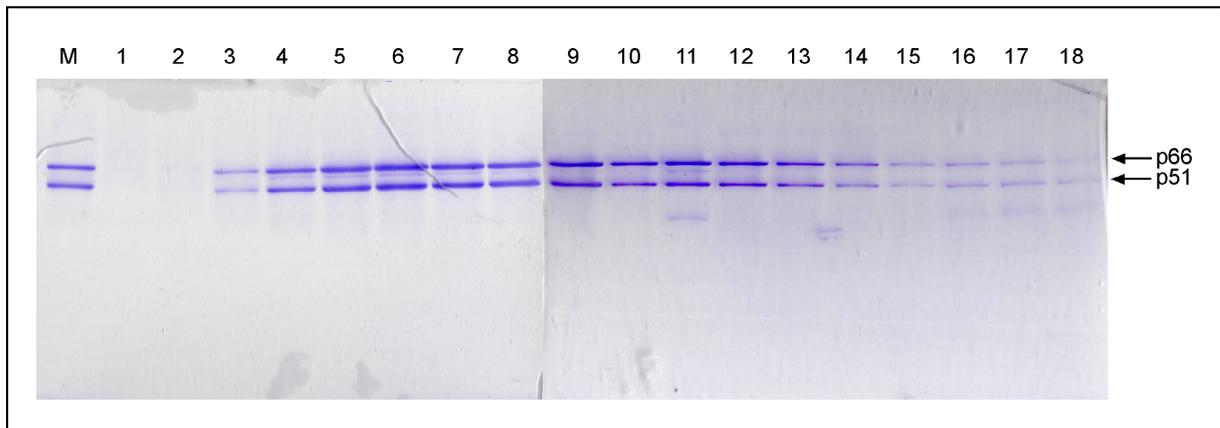


Abbildung 4.3: **Aufreinigung der HIV-1 Reversen Transkriptase über eine Gelfiltrationssäule.** Die aufgefangenen Fraktionen sind auf einem Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gel gezeigt. Spur M: HIV-1 RT Standard. Spur 1–18: Elutionsfraktionen.

4.1.2 Präparation der p51 Untereinheit der Reversen Transkriptase

Alle Klonierungsarbeiten zur Herstellung der mutierten p51 Proteine wurden von Eliane Schweizer und Karin Vogel-Bachmayer mithilfe verschiedener PCR-Methoden am Max-Planck-Institut in Dortmund durchgeführt. Dabei wurden entweder die Positionen 331 (Lysin), 363 (Asparagin) oder 364 (Asparaginsäure) jeweils durch ein Alanin ersetzt. Um den Einfluss der einzelnen Punktmutationen in der p51 Untereinheit auf das Dimerisierungsverhalten des RT Heterodimers untersuchen zu können, mussten die mutierten Proteine zunächst aufgereinigt werden. Die Aufreinigung verlief nach einem etablierten Protokoll in zwei chromatographischen Schritten. Dabei wurde für die Affinitätschromatographie im ersten Schritt die Anwesenheit eines Polyhistidinetiketts am N-Terminus der p51 Untereinheit ausgenutzt. In Abbildung 4.4 sind die Elutionsfraktionen nach der Ni-NTA-Säule dargestellt, die bereits einen hohen Reinheitsgrad aufwiesen.

Eine anschließende Aufreinigung über eine Ionenaustauscherkombination ermöglichte es, die restlichen Kontaminationen zu entfernen. Auf einem SDS-Gel konnten - auch bei hohen p51-Proteinmengen - keine bakteriellen Proteine mehr ausgemacht werden (Abbildung 4.5). Typischerweise konnten pro 10 g Zellmasse ca. 13 mg rekombinantes p51-Protein gewonnen werden.

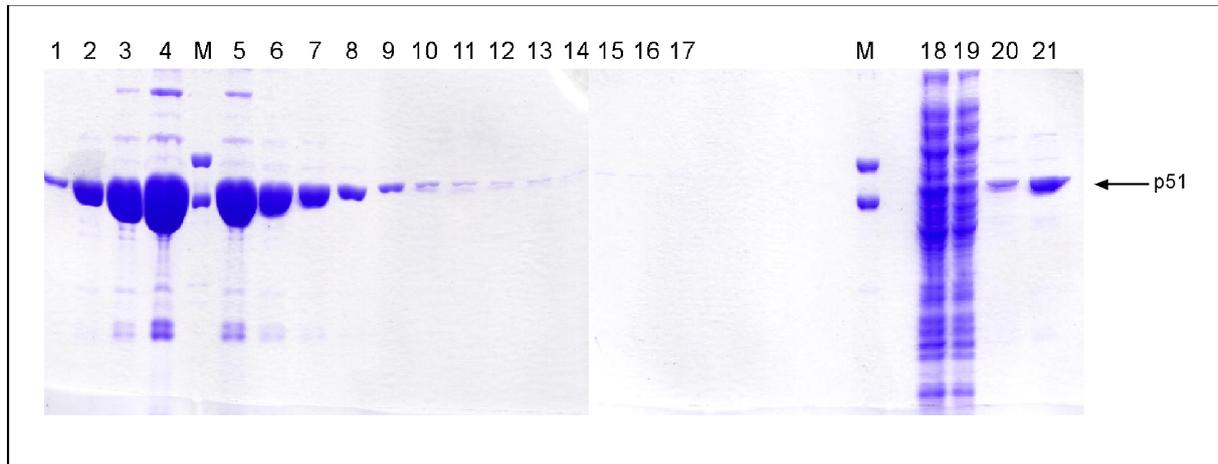


Abbildung 4.4: **Aufreinigung der HIV-1 RT p51 Untereinheit über eine Ni-NTA-Säule.** Die einzelnen Fraktionen wurden auf einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Coomassie-Blau gefärbt. Als Größenstandard wurde gereinigte HIV-1 RT eingesetzt: Spur M. Elutionsfraktionen: Spur 1–17; löslicher Überstand nach Aufschluss: Spur 18; Durchfluss: Spur 19; Waschfraktionen: Spur 20–21.

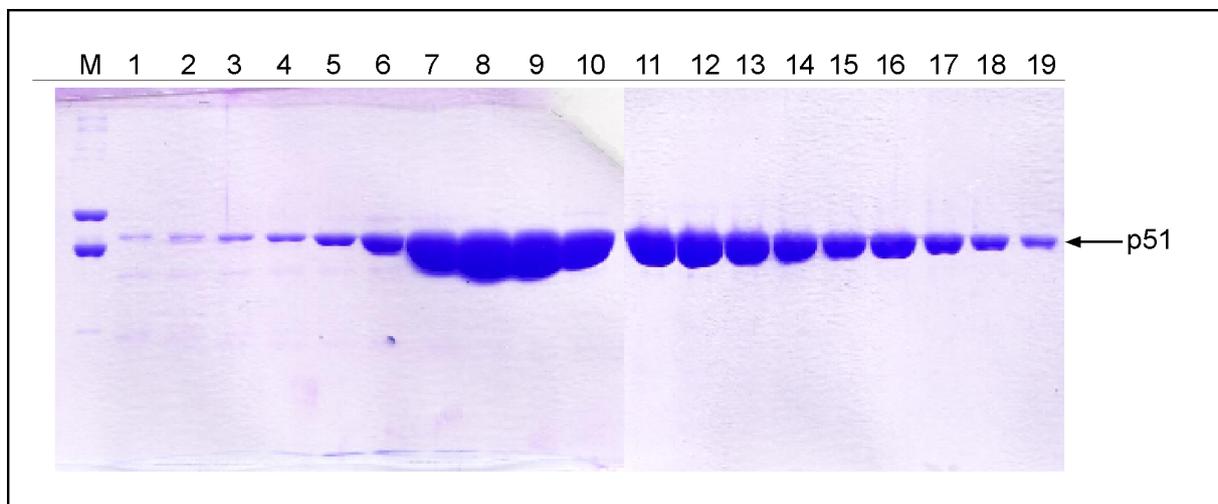
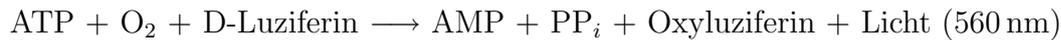


Abbildung 4.5: **Elution der HIV-1 RT p51 Untereinheit von einer Hi-Trap-SP-Säule.** Die eluierten Fraktionen wurden auf einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt. Als Größenstandard wurde gereinigte HIV-1 RT eingesetzt: Spur M. Elutionsfraktionen: Spur 1–19.

4.1.3 Expression und Aufreinigung der firefly Luziferase

Für die Emission von Licht ist beim Käfer *Photinus pyralis* das Protein Luziferase verantwortlich. Luziferase ist ein monomeres Protein von 62 kDa, das folgende Reaktion katalysiert:



Die Reaktion liefert die höchste Quantenausbeute, die in einem Biolumineszenzsystem bisher ermittelt wurde. Für jedes oxidierte D-Luziferin-Molekül wird nahezu ein Photon emittiert. Weitere Vorteile stellen die geringe Hintergrundstrahlung im *in vitro* Experiment, die hohe Sensitivität und die einfache Handhabung dar. Aus diesen Gründen wird das Luziferasesystem häufig als quantitativer Assay und als Reportersystem genutzt. Um die Luziferase in solchen Systemen anwenden zu können, wurde in dieser Arbeit das Luziferasegen in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert und zusätzlich ein Expressions- und Aufreinigungsprotokoll für das Protein etabliert.

4.1.3.1 Klonierung und Expression

Zur Gewinnung rekombinanter *firefly* Luziferase sollte ein möglichst zuverlässiges Expressionssystem gefunden werden, das ein einfaches und effizientes Aufreinigungsprotokoll zulässt. In dieser Arbeit wurde der Vektor pGEX-4T-1 TEV genutzt (freundlicherweise von Dr. Matthias Geyer, MPI, Dortmund zur Verfügung gestellt), der das Gen für Glutathion S-Transferase (GST) trägt. In die multiple Klonierungsstelle sollte das Luziferasegen eingefügt werden, sodass das ein Fusionsprotein exprimiert wird, das über den GST-Anteil in einem Affinitätschromatographieschritt leicht isoliert werden kann. Zusätzlich werden zwei Protease-Schnittstellen (Thrombin, TEV) kodiert, die eine Abspaltung des GST-Proteins vom Zielprotein erlauben (Abbildung 4.6).

Die Gensequenz der Luziferase wurde aus dem Vektor pACYC 177 T7-Luc, der freundlicherweise von Dr. Jochen Reinstein (Max-Planck-Institut, Dortmund) zur Verfügung gestellt wurde, über eine PCR-Amplifikation gewonnen. Die genspezifischen Primer generierten am 5'-Ende eine Sal I- und am 3'-Ende eine Nco I-Schnittstelle. Vektor und PCR-Fragment wurden mit beiden Enzymen verdaut, das linearisierte Plasmid und das geschnittene PCR-Fragment über ein Gel aufgereinigt und der Vektor dephosphoryliert. Anschließend wurde die Luziferase-Sequenz und das linearisierte Plasmid ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in elektrokompente XL1-Zellen transformiert und die Bakterien auf Ampicillinresistenz selektiert. Positive Klone wurden in einer Flüssigkultur angezogen und das Plasmid über eine Mini-Präparation isoliert. Die Anwesenheit des

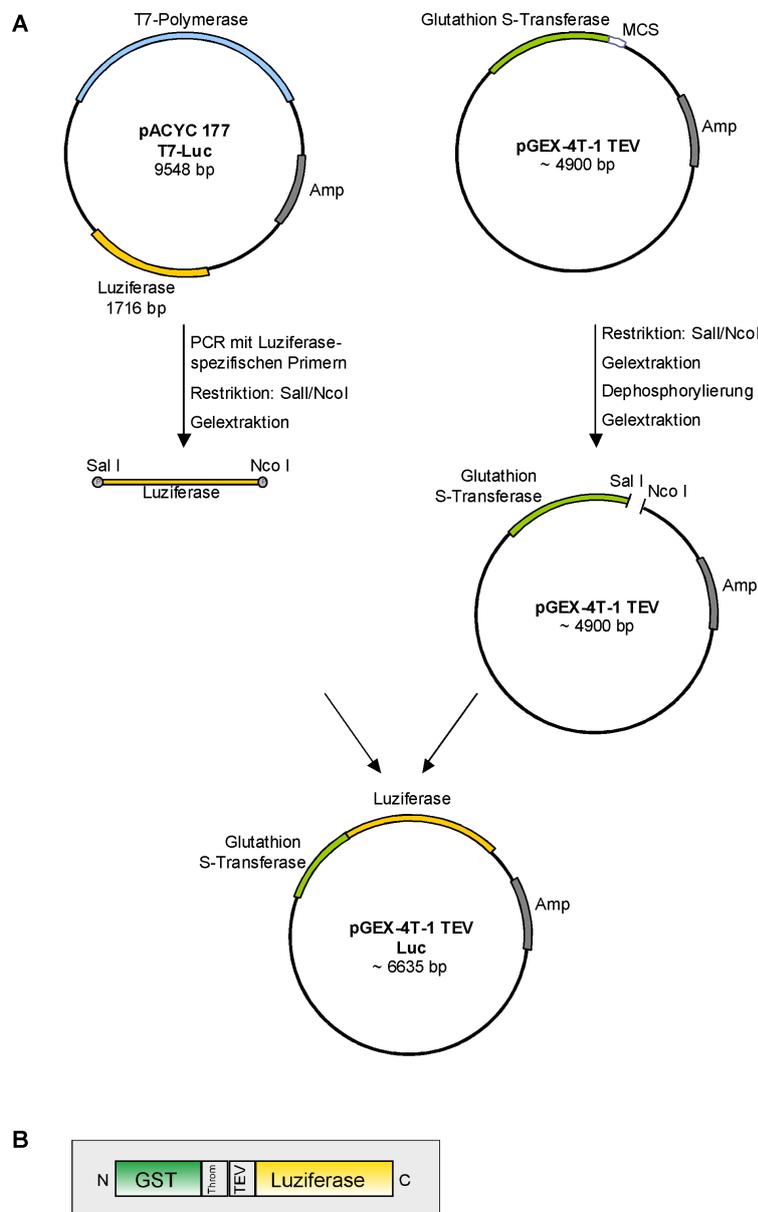


Abbildung 4.6: **Klonierung des Luziferasegens in den Vektor pGEX-4T-1 TEV.** **A.** Das Gen für die *firefly* Luziferase wurde aus dem Vektor pACYC 177 T7-Luc amplifiziert. Die an den Enden generierten Restriktionsschnittstellen erlaubten eine Ligation in den mit Sal I und Nco I linearisierten Vektor. **B.** Schematische Darstellung des klonierten Fusionsproteins. An den N-terminalen GST-Anteil schließen sich die Proteaseschnittstellen für Thrombin (THR) und TEV-Protease (TEV) an. Die Luziferase befindet sich am C-Terminus.

Luziferase-Gens wurde mithilfe einer PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern überprüft. Zur Expression wurde der Bakterienstamm BL21 DE3 genutzt.

Testexpressionen zeigten, dass das rekombinante Protein bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C fast ausschließlich in Einschlusskörperchen vorlag. Aus diesem Grund wurden die Kulturen bei niedrigeren Temperaturen inkubiert. Bei einer Kultivierungstemperatur von 25 °C konnten circa 50 % des Proteins in der löslichen Fraktion wiedergefunden werden, was im Folgenden als Standardinkubationstemperatur gewählt wurde.

4.1.3.2 Präparation und Charakterisierung der rekombinanten Luziferase

Da die rekombinante Luziferase mit einem Glutathion-S-Transferase-Anteil ausgestattet war, konnte in einem ersten Aufreinigungsschritt eine Affinitätschromatographie genutzt werden. Nahezu alle bakteriellen Proteine konnten in diesem Schritt abgetrennt werden. Das Fusionsprotein weist eine Größe von 84 kDa auf und konnte im SDS-Gel identifiziert werden. Lediglich ein kontaminierendes Protein von ca. 60 kDa wurde koeluiert (Abbildung 4.7, Spur 3). Dieses Protein konnte jedoch im Anschluss über eine Ionenaustauschersäule abgetrennt werden. Unter den gewählten Bedingungen eluierte die Luziferase bei 200 mM NaCl. Zur endgültigen Reinigung wurde eine Gelfiltration angeschlossen. Nach diesem letzten Schritt lag die Luziferase in ca. 95 %iger Reinheit vor. Bei einem Molekulargewicht von etwa 62 kDa und 27 kDa sind zwei weitere, sehr schwache Banden im Gel zu erkennen. Nach Verdau des Fusionsproteins mit der TEV-Protease sind diese Banden ebenfalls zu finden (Spur 6). Daher liegt der Schluss nahe, dass diese Banden - aufgrund der Größe als auch dem gleichen gelelektrophoretischen Verhalten - den Spaltprodukten des Fusionsproteins zuzuordnen sind (Luziferase: 61,4 kDa, GST: 22,6 kDa). Die Ausbeute lag bei ca. 0,16 mg rekombinantes Protein pro Gramm eingesetzter Zellmasse.

Der Aufreinigungsgrad der präparierten Luziferase konnte zusätzlich über die spezifische Aktivität nachvollzogen werden. Hierbei wurde der emittierte Lumineszenzwert auf die Gesamtmenge an Protein bezogen (RLU / mg Protein). Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen, nimmt der Wert der spezifischen Aktivität mit steigendem Aufreinigungsgrad zu. Im Rohextrakt liegt er bei ca. 10, während er nach der Glutathionsäule bereits bei 57 liegt. Nach der Anionenaustauschersäule konnte im Eluat ein weiterer Anstieg der spezifischen Aktivität verzeichnet werden (ca. 70), der sich nach der Gelfiltration nur noch unwesentlich auf 72 steigert. Dies steht in guter Übereinstimmung zur gelelektrophoretischen Analyse, in der das Protein bereits nach Reinigung am Anionenaustauscher sehr rein vorliegt.

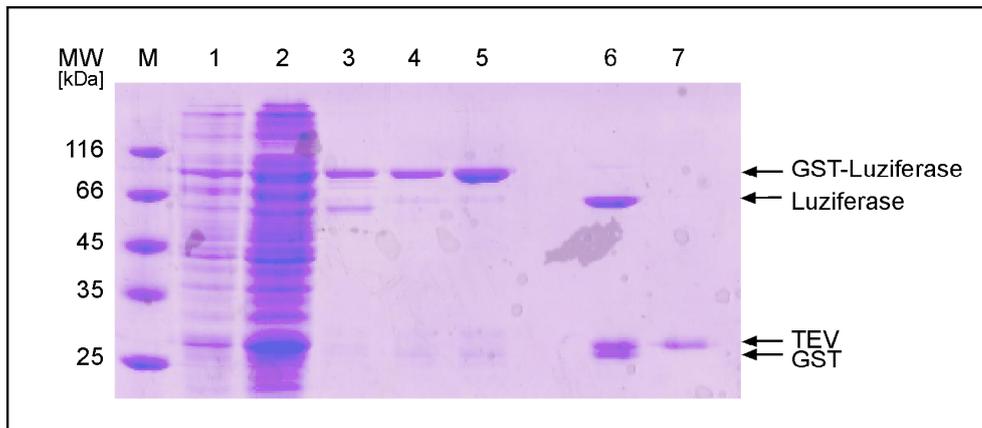


Abbildung 4.7: **Aufreinigung der firefly Luciferase.** Die von den verschiedenen Säulen eluierten Fraktionen wurden auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt. Spur M: Molekulargewichtsmarker, 1: Aufschluss, 2: löslicher Überstand nach Aufschluss, 3: Glutathion-Affinitätssäule, 4: Resource Q-Ionenaustauschersäule, 5: Gelfiltration, 6: rekombinante Luciferase nach Spaltung mit TEV-Protease, 7: TEV. Es wurden jeweils ca. 2 μ g Luciferase pro Spur aufgetragen.

Wird die pGEX-Plasmidfamilie zur Klonierung und Expression von Fusionsproteinen genutzt, wird oftmals eine Koaufrreinigung des bakteriellen Hitzeschockproteins DnaK (66,8 kDa) beobachtet [120]. DnaK benötigt für seine Chaperonaktivität ATP. Daher kann die Anwesenheit des Proteins über die ATP-Spaltungsaktivität nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde in diesen Tests alkalische Phosphatase verwendet, die ebenfalls eine ATPase-Aktivität besitzt. Nach der Glutathionsäule war bei der Aufreinigung der Luciferase eine Verunreinigung im Größenbereich von DnaK zu beobachten (Abbildung 4.7, Spur 3). Um die Präparationen auf eine Kontamination durch DnaK zu überprüfen, wurde die ATPase-Aktivität bestimmt. In der Eluatfraktion der Glutathionsäule konnte eine massive ATPase-Aktivität nachgewiesen werden (4.8 B). Wurde die Luciferase darüber hinaus über eine Ionenaustauscher- und Gelfiltrationssäule gereinigt, konnte mit 11 % im Eluat nur eine sehr geringe ATPase-Aktivität ausgemacht werden, was in Übereinstimmung mit den SDS-Gelanalysen darauf hinweist, dass die DnaK-Kontamination mit dieser Aufreinigungsstrategie nahezu vollständig entfernt werden konnte. Die Restaktivität von 10 % stammt möglicherweise von der intrinsischen Aktivität der Luciferase, da Biolumineszenzreaktion ebenfalls unter ATP-Verbrauch stattfindet.

Im Vergleich mit der von der Firma Promega vertriebenen rekombinanten Luciferase weist die hier präparierte Luciferase eine um ca. 1/3 reduzierte spezifische Aktivität auf

(Daten nicht gezeigt). Die ATPase-Aktivität befindet sich im gleichen Bereich, was auf einen ähnlichen Reinigungsgrad schließen lässt.

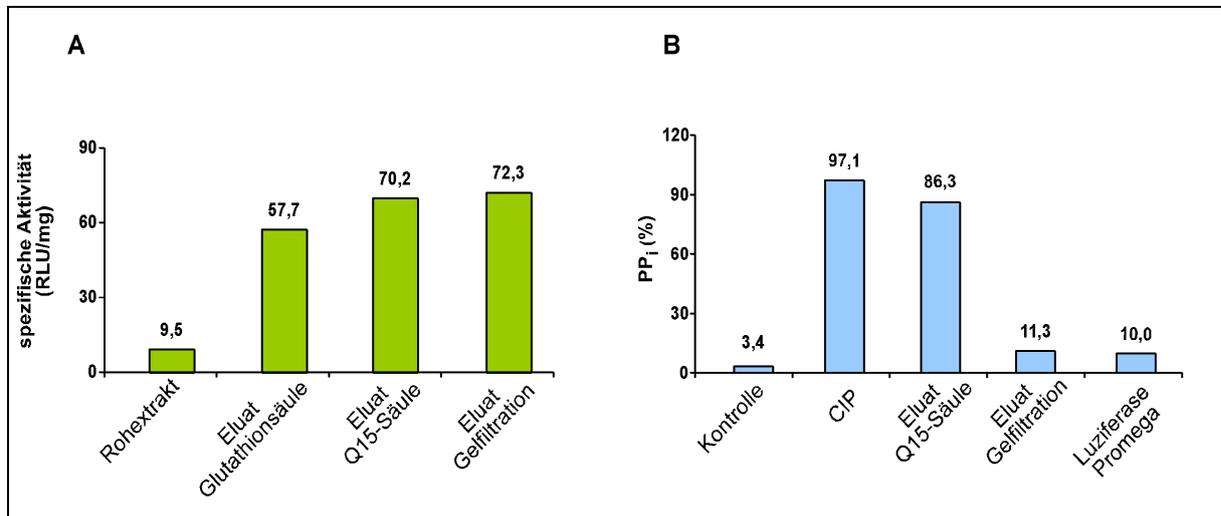


Abbildung 4.8: **Charakterisierung der rekombinanten Luziferase über die spezifische Aktivität und ATPase-Aktivität.** Die Fraktionen der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden auf **A**: Proteingehalt und Biolumineszenzaktivität (spezifische Aktivität = Biolumineszenz/Proteingehalt) und **B**: ATPase-Aktivität getestet, um den Anteil der Luziferase am Gesamtprotein und Verunreinigungen durch DnaK nachzuvollziehen. Es wurde eine Luziferasekonzentration von 7,7 nM in den Reaktionsansätzen eingestellt. CIP: alkalische Phosphatase, Kontrolle: Ansatz ohne Protein.

4.2 Inhibition der Dimerisierung der Reversen Transkriptase

Seit Entdeckung der Korrelation zwischen Dimeranteil und Aktivität der HIV-1 Reversen Transkriptase [117] ist die p51-p66-Wechselwirkung ein interessantes und vielversprechendes Ziel zur Inaktivierung des Enzyms. Daher war es in dieser Arbeit von großem Interesse, die Struktur-Funktionsbeziehungen dieser Protein-Protein-Wechselwirkung detailliert zu studieren, um anschließend unterschiedliche Strategien zur Inhibition zu testen. Die Vielfalt der Strategien spiegelte sich in der Diversität der getesteten Molekülklassen wieder: neben Nukleinsäuren wurden auch Peptide und niedermolekulare Moleküle in die Inhibitorsuche eingeschlossen.

4.2.1 Charakterisierung des Dimerisierungsprozesses über Mutationsstudien in der p51 UE

Durch detaillierte Analysen der HIV-1 RT Röntgenstruktur konnten in der p51 Untereinheit drei Aminosäuren identifiziert werden, die potenziell an der Interaktion der beiden RT Untereinheiten beteiligt sein könnten (Arbeiten durchgeführt von E. Schweizer, ETH Zürich). Dabei handelt es sich um ein Lysin an der Position 331, das eine Salzbrücke zum Aspartat an Position 364 ausbilden kann. Außerdem wurde eine π - π Wechselwirkung zwischen dem Asparagin 363 und dem Tryptophan 410 der p66 Untereinheit vermutet. Alle mutierten Aminosäuren bilden direkte oder indirekte Kontakte zu den Tryptophanen 410 und 402 in der p66 UE und dem an Position 401 befindlichen Tryptophan der p51 UE aus, die die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den beiden UE vermitteln.

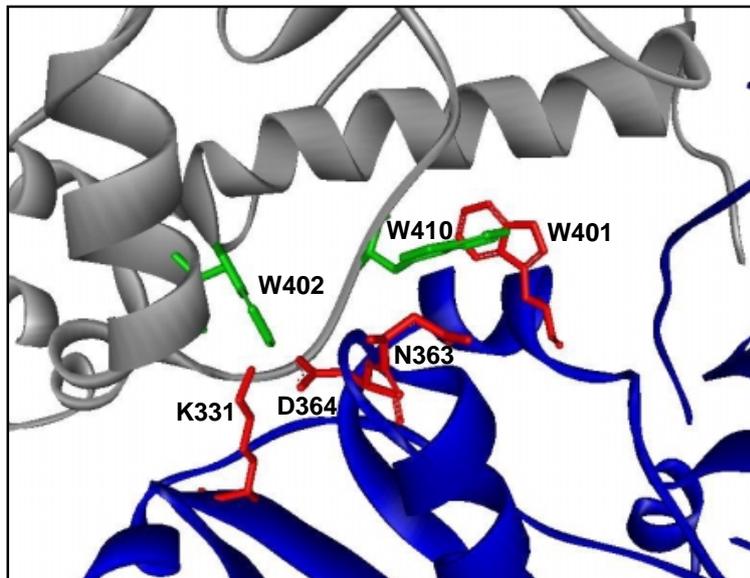


Abbildung 4.9: **Ausschnitt aus dem Tryptophan-Cluster der HIV-1 Reversen Transkriptase.** Mögliche Interaktionspartner der Aminosäuren K331, N363 und D364 aus der p51 Untereinheit sind gekennzeichnet. Die p66 Untereinheit ist in grau, die p51 Untereinheit in blau dargestellt. Relevante Aminosäureseitenketten der p66 Untereinheit sind in grün, der p51 Untereinheit in rot hervorgehoben (Struktur HIV-1 RT: 1RTH).

Um den Einfluss dieser Aminosäuren auf die Dimerisierung zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit zunächst die mutierten p51 Untereinheiten exprimiert und aufgereinigt (siehe Abschnitt 4.1.2). Anschließend wurde die Fähigkeit zur Dimerisierung mit der p66 Untereinheit überprüft. Dazu wurde ein *in vitro* Dimerisierungsassay genutzt (vgl. 3.4.1.2).

Da die separat gereinigte p66 Untereinheit stabile Homodimere ausbildet, wurde der eingesetzte Anteil der p66 UE zunächst mit dem organischen Lösungsmittel Acetonitril versetzt und dadurch eine Dissoziation der Homodimere herbeigeführt, sodass die p51 Untereinheit eine Assoziation mit p66 eingehen konnte. Die jeweiligen Untereinheiten lagen in einer Konzentration von $1,175 \mu\text{M}$ im Ansatz vor. Die Ausbildung des Heterodimers wurde über die Zeit anhand von Gelfiltrationsanalysen verfolgt (Abbildung 4.10 A).

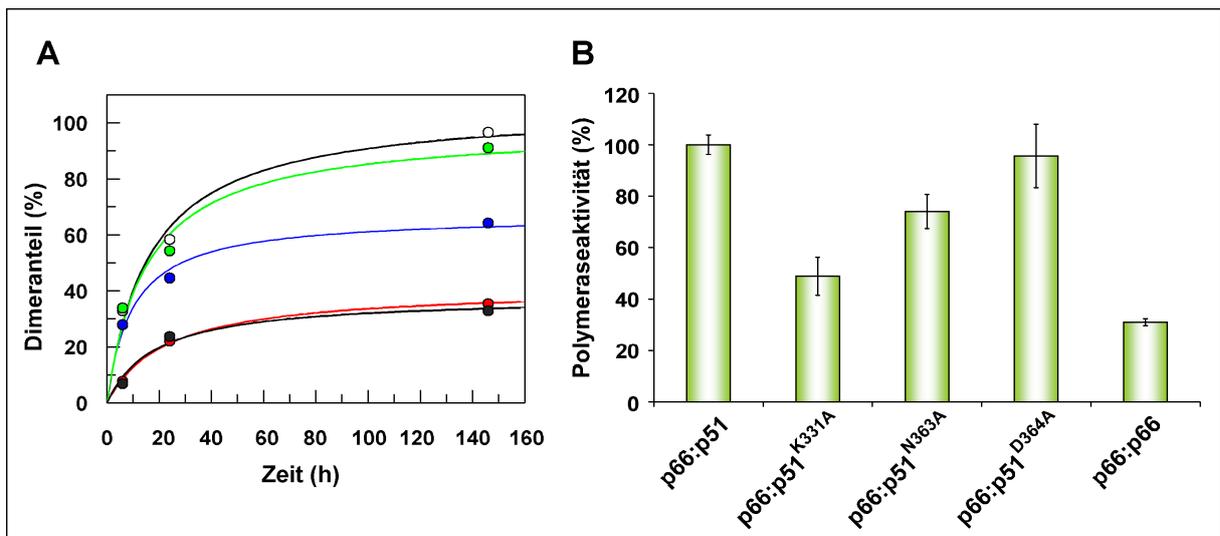


Abbildung 4.10: **Einfluss der p51 Mutationen auf die Polymeraseaktivität in Abhängigkeit vom Dimergehalt.** **A.** Assoziationskinetik: Die jeweilige p51 Mutante (nicht gefüllte Kreise: Wildtyp, rot: p51^{K331A}, blau: p51^{N363A}, grün: p51^{D364A}) bzw. p66 (schwarz) wurde aufgereinigt und die Assoziation mit der monomerisierten p66 Untereinheit über die Zeit verfolgt. Der Dimergehalt wurde über Gelfiltrationsmessungen bestimmt. **B.** In einem Standard-Polymerasetest wurde nach 150 h die enzymatische Aktivität der RT in den Assoziationsansätzen überprüft. Der Assoziationsansatz mit Wildtyp-p51 wurde auf 100 % gesetzt.

Für die Assoziation des Wildtyp p51-Proteins mit der p66 UE konnte beobachtet werden, dass nach ca. 150 Stunden nahezu 100 % der detektierten Proteine in der Dimerform vorliegen. Ähnlich verhielt es sich für die Alaninmutante an Position 364. Hier wurden 96 % als Dimer wiedergefunden. Eine veränderte Situation war für die Mutante N363A zu verzeichnen. In diesem Fall waren nach 146 h nur 64 % dimerisiert. Eine deutlich reduzierte Dimerbildung trat bei der Mutante K331A auf. Im Reassoziationsansatz lagen nach 146 Stunden lediglich 35,5 % als Dimer vor. Zur Kontrolle wurde die Homodimerbildung von p66 verfolgt. In diesem Fall wurden 33 % homodimeres Protein gebildet.

Neben dem verringerten Dimeranteil konnte für die Mutante K331A zusätzlich eine deutlich verlangsamte Dimerbildung beobachtet werden. Während für den Wildtypansatz nach ca. 16 h 50 % des späteren Dimeranteils assoziiert waren, wurde für die Mutante K331A der halbmaximale Dimeranteil erst nach 22 h erreicht.

Eine reduzierte Dimerbildung sollte sich in einer verringerten Polymeraseaktivität widerspiegeln. Die Reassoziationsansätze wurde daher nach 146 h in einen Standard-Polymeraseassay eingebracht (vgl. 3.4.3), in dem die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität gemessen wurde. Wie in Abbildung 4.10 B zu erkennen, korreliert die verringerte Polymeraseaktivität der Ansätze mit mutierten p51 Protein sehr gut mit dem Dimergehalt. Die Mutante K331A zeigte einen Dimeranteil von 35 % und eine Polymeraseaktivität von 49 % im Vergleich zum Wildtyp. Neben der am stärksten verringerten Assoziationsfähigkeit weist die Mutante auch im Polymerasetest die stärkste Beeinträchtigung der RT-Aktivität auf. Die enzymatische Aktivität ist bei der Mutante N363A mit 78 % ebenfalls verringert. Wie aus dem Dimerisierungstest zu erwarten, ist die Polymeraseaktivität der Mutante D364A vergleichbar mit dem Wildtyp. Für das p66 Homodimer wurde gezeigt, dass es ebenfalls enzymatisch aktiv sein kann [117, 116]. Daher ist es nicht überraschend, dass für den p66 Assoziationsansatz eine Polymeraseaktivität verzeichnet werden konnte (31 %), der auf die Ausbildung eines p66 Homodimers zurückzuführen ist. Die Auflösung der verwendeten Gelfiltrationssäule erlaubte keine Differenzierung zwischen homo- und heterodimerer Form der RT. So wäre es möglich, dass der Dimeranteil im Assoziationsansatz mit K331A auf eine Homodimerisierung der p66 UE zurückzuführen ist (Dimeranteil p51^{K331A}/p66: 33 %, p66/p66: 35 %; Polymeraseaktivität p51^{K331A}/p66: 31 %, p66/p66: 35 %) und die eingeführte Mutation die Heterodimerisierung vollständig verhindert.

In beiden Assays konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure K331A einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung des Heterodimers hat. Eine Mutation an dieser Position verringert den Dimergehalt auf 35 %, was mit einer reduzierten Polymeraseaktivität einhergeht. Ein ähnlicher, aber schwächerer Effekt, konnte für die Mutation der Asparaginsäure 363 festgestellt werden, während die Mutation des Asparagins an Position 364 zu einem Alanin keine Auswirkungen hatte.

4.2.2 Niedermolekulare Moleküle als Dimerisierungsinhibitoren

Wie bereits ausgeführt und gezeigt, trägt der Tryptophan-Cluster innerhalb der p66 Untereinheit der RT entscheidend zur Stabilität des Heterodimers bei. Eine Verminderung der Wechselwirkungen innerhalb des Clusters führt demnach zur verminderten Dimerstabilität, die sich in einer verringerten enzymatischen Aktivität niederschlägt.

Eine wirkungsvolle Inhibierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen konnte mehrfach durch niedermolekulare Moleküle hervorgerufen werden (zur Übersicht [10, 163]). Die Reduzierung von Protein-Wechselwirkungen durch niedermolekulare Moleküle sollte auch auf die Wechselwirkung der p66 und p51 UE übertragen werden. Im Rahmen des EU-Projektes TRIOH (*Targeting Replication and Integration of HIV*) war es in Kooperation mit Prof. Botta (Universität Sienna) möglich, diese Idee umzusetzen. Die biochemische Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen RT und Inhibitor-Molekül setzten umfassende computergestützte Studien voraus, die von Valentina Corradi (Universität Sienna) durchgeführt wurden. Der Ansatz umfasste ein virtuelles (*in silico*) Screening chemischer Bibliotheken nach kleinen Molekülen, die mit großer Wahrscheinlichkeit an das Tryptophan-Motiv der p66 UE binden und dadurch die Interaktion mit der p51 UE verringern. In *in vitro* Tests wurde geprüft, ob die Substanzen tatsächlich die Dimerisierung beeinflussen und positive Kandidaten weitergehend biochemisch charakterisiert.

4.2.2.1 Computergestützter Ansatz zur Selektion niedermolekularer Dimerisierungsinhibitoren

Die dreidimensionale Anordnung des RT-Polypeptids wurde mehrfach über Röntgenstrukturanalysen bestimmt, die für weitere Modellierungsstudien verwendet werden können. Für die durchgeführten Computerstudien wurde die von Ren *et al.* gelöste Struktur der RT (1RTH) aus der Brookhaven Proteindatenbank ausgewählt [115]. Innerhalb der für die Dimerisierung essentiellen Interaktionsdomäne der p66 UE befinden sich die Tryptophane 402 und 410 (siehe Abbildung 4.9), die einen wesentlichen Beitrag zur Dimerstabilität leisten. Ziel war es daher, Moleküle zu identifizieren, die eine Wechselwirkung mit den Tryptophanen 402 und 410 eingehen können. Die Selektion potenzieller Inhibitor-Moleküle vollzog sich in mehreren Schritten, die in Abbildung 4.11 A zusammengefasst sind.

Zunächst wurden computergestützte Modellierungsstudien (*Molecular Modelling*) durchgeführt, um die Flexibilität der Verbindungsdomäne zu prüfen. Diese Studien ermöglichten die Entwicklung eines dynamischen Pharmakophormodells (das Tryptophan-Cluster der p66 UE der RT wird in diesem Zusammenhang als Pharmakophor bezeichnet). Molekül-Molekül-Interaktionen werden größtenteils über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt. Das Pharmakophormodell beschreibt die dreidimensionale Anordnung der chemischen Eigenschaften (Hydrophobizität der Region, Wasserstoffbrückendonoren oder -akzeptoren) der relevanten Aminosäureseitenketten (siehe 4.11 B). Das Modell definiert gleichzeitig die Anforderungen

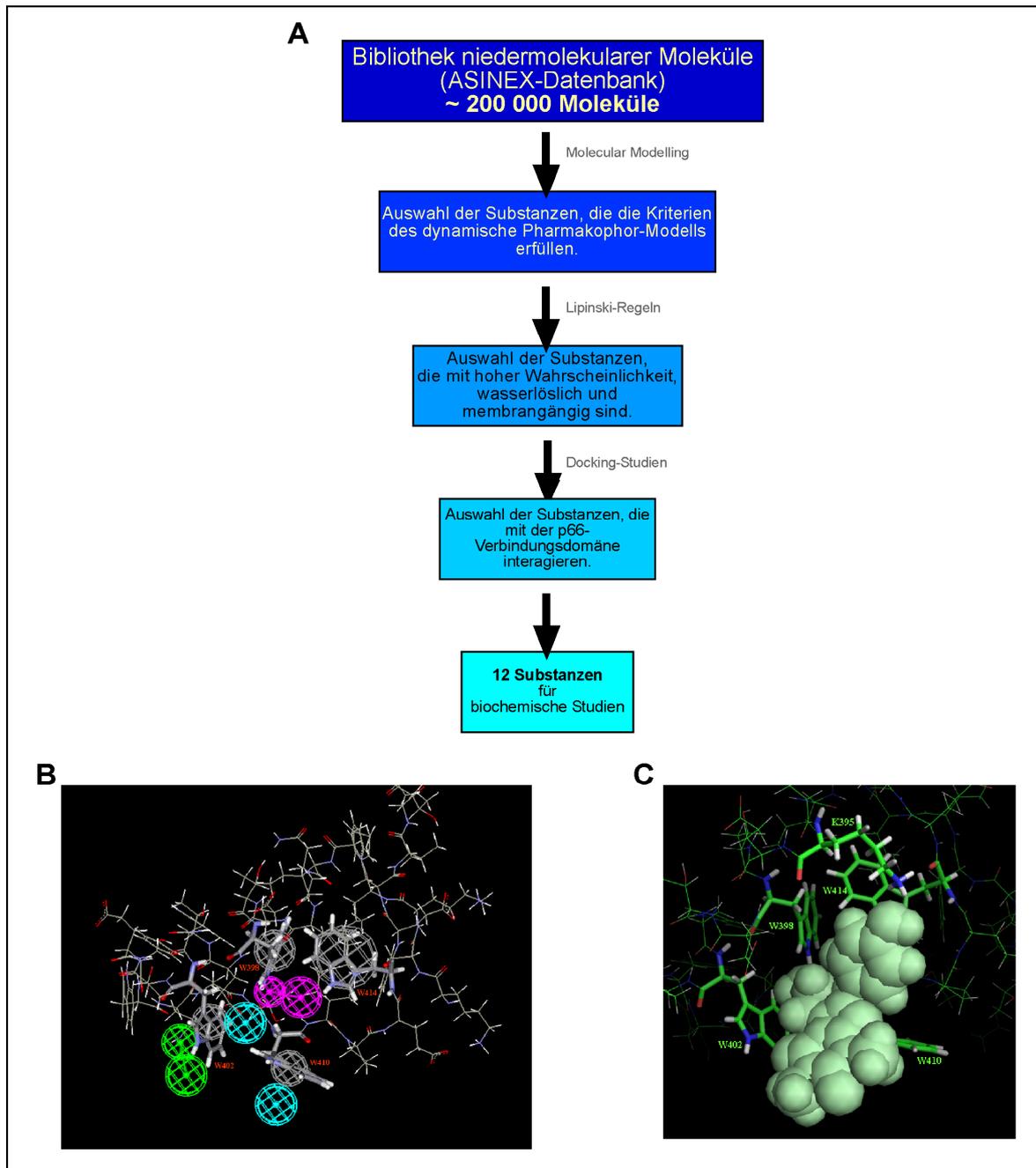


Abbildung 4.11: **Identifizierung niedermolekularer Substanzen als Modulatoren der RT-Dimerisierung.** **A:** Selektions-Protokoll für die Computerstudien. **B:** Über *Modelling*-Studien berechnetes dynamisches Pharmakophormodell der Verbindungsdomäne der p66 UE. Grau: von der Wechselwirkung mit Interaktoren ausgeschlossene Bereiche, Pink: Wasserstoffbrückendonoren, Grün: Wasserstoffbrückenakzeptoren, Türkis: hydrophobe Bereiche. **C:** Position der Substanz MAS 1 (Kugelmodell) relativ zur p66 UE.

an das Molekül, das in der Verbindungsdomäne binden soll. Für die Durchmusterung der chemischen Bibliothek ASINEX wurden die im Pharmakophormodell bestimmten Parameter angelegt. Alle ausgewählten Substanzen wurden anhand der Lipinski-Regeln auf ihre Wasserlöslichkeit und Membrangängigkeit hin überprüft, um spätere Komplikationen hinsichtlich der zellulären Aufnahme zu vermeiden [93, 94]. Die Moleküle, die die Selektionskriterien erfüllten, wurden abschließend über computerbasierte *Docking*-Studien auf ihre tatsächliche Interaktionsfähigkeit mit der p66 UE überprüft. Abbildung 4.11 C zeigt die räumliche Anordnung der Substanz MAS 1 in Relation zur p66 UE. Zwölf Substanzen genügten den Anforderungen und wurden von der Firma ASINEX bezogen. Zehn dieser Substanzen wurden bisher zur biochemischen Charakterisierung übermittelt. Die Strukturen der selektierten Substanzen können in dieser Arbeit aus patentrechtlichen Gründen nicht aufgeführt werden.

4.2.2.2 Charakterisierung der verminderten Reassoziationsansatz in Anwesenheit von MAS 0 und MAS 1

Die zehn selektierten ASINEX-Substanzen (MAS) sollten nach den Computerstudien *in vitro* auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Dabei sollte sowohl die Interaktion mit den monomerisierten UE (Reassoziationsansatz) als auch die Wechselwirkung mit der dimeren Form der RT betrachtet werden (Dimeransatz).

Für den Reassoziationsansatz wurde dimeres Protein mit Acetonitril dissoziiert und anschließend in Anwesenheit der MAS-Substanzen durch 1:15 Verdünnung in Acetonitril-freiem Puffer reassoziert (vgl. 3.4.1.3). Die Verteilung zwischen monomerer und dimerer Form der RT konnte darauffolgend über Gelfiltrationsanalysen untersucht werden. Die MAS-Substanzen wurden – wie vom Anbieter empfohlen – in 100 % DMSO gelöst. Zwei der ASINEX-Substanzen waren in DMSO nur schwer löslich und wurden nicht weiter verwendet. Vier weitere Substanzen fielen nach Überführen in das wässrige Puffersystem aus und konnten für weitere Studien nicht herangezogen werden. Für die ersten Studien mit den vier verbleibenden Substanzen wurde eine MAS-Konzentration von 1 mM eingesetzt. Für zwei der Substanzen konnte ein deutlicher Einfluss auf die Reassoziationsansatz ausgemacht werden. Wie in Abbildung 4.12 zu erkennen, beeinträchtigten die Substanzen MAS 0 und MAS 1 die Dimerbildung. Bei einer RT-Konzentration von $1,27 \mu\text{M}$ reduzierte MAS 0 den Dimeranteil auf 72 %, MAS 1 auf 52 % (der Dimeranteil der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt).

Um die verminderte Reassoziationsansatz detaillierter zu untersuchen, wurde für MAS 1 die Zeitabhängigkeit der Reassoziationsansatz über 24 h gemessen (siehe 4.13 A). Im Vergleich zum Ansatz ohne Wirkstoff konnte jeweils eine verminderte Dimerbildung um fast 50 % beob-

achtet werden. Für beide Substanzen wurde außerdem die Konzentrationsabhängigkeit der Reassoziationsinhibition gemessen. Dabei wurde der Reassoziationsansatz im Fall von MAS 0 für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Fall von MAS 1 wurde eine Inkubationszeit von 4 h gewählt, da - wie aus den Studien zur Zeitabhängigkeit hervorging - zu diesem Zeitpunkt ein Großteil des Proteins bereits reassoziert vorlag. Höhere MAS-Konzentrationen als 1 mM wurden nicht eingesetzt, weil der DMSO-Anteil über 1 % gestiegen wäre und hohe DMSO-Konzentrationen sich negativ auf die Reassoziationsauswirkung auswirkten (Daten nicht gezeigt). Die Abnahme des Dimeranteils korrelierte in diesen Versuchen streng mit der eingesetzten MAS-Menge. Nach Auswertung der Kurven konnte der IC_{50} ermittelt werden, der die MAS-Konzentration angibt, bei der 50 % des beobachteten Inhibitionseffektes erreicht wurde. Für MAS 0 ergab sich ein IC_{50} von $64 (\pm 17) \mu\text{M}$ für MAS 1 ein IC_{50} von $316 (\pm 127) \mu\text{M}$. Der Dimergehalt ist durch Zugabe von MAS 1 deutlich stärker reduziert. Allerdings ist eine höhere Konzentration der Substanz nötig.

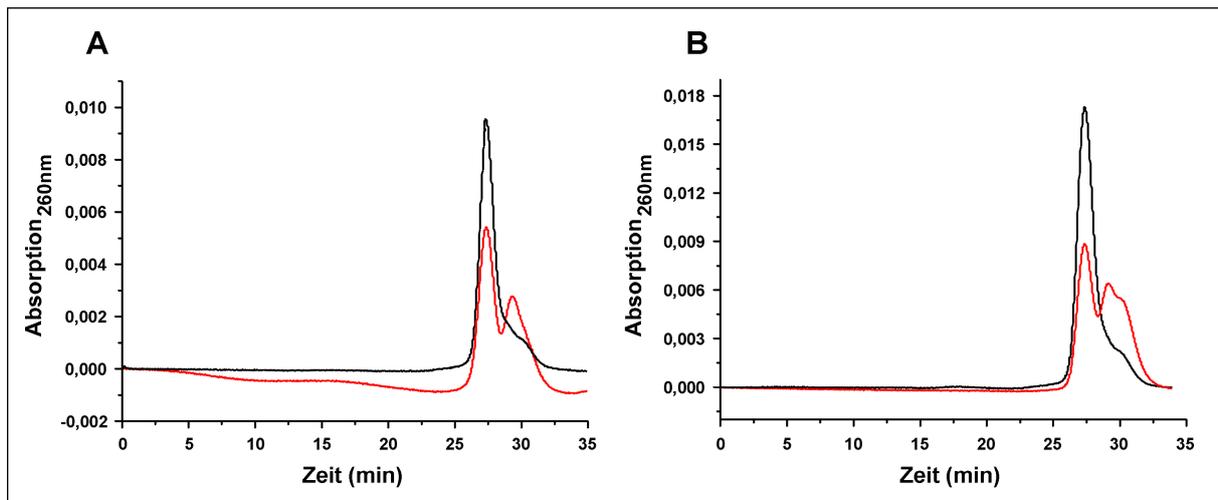


Abbildung 4.12: **Inhibition der Reassoziationsinhibition durch MAS 0 und MAS 1.** Durch Acetonitril dissoziierte RT wurde 1:15 in Acetonitril-freiem Puffer in Anwesenheit von 1 mM MAS 0 (A) bzw. MAS 1 (B) verdünnt (Endkonzentration $1,27 \mu\text{M}$) und für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Es sind Elutionsprofile der Ansätze in Abwesenheit (schwarze Linie) bzw. in Anwesenheit (rote Linie) der MAS-Substanzen gezeigt.

Im Weiteren wurde überprüft, ob MAS 0 und MAS 1 die dimere Form der Reversen Transkriptase aktiv dissoziieren können. In diesem Fall wurden RT und MAS-Konzentra-

tionen wie zuvor gewählt, ohne jedoch das Dimer einer Acetonitril-Behandlung zu unterziehen. Die Ansätze wurden entweder für 1 oder 24 h bei Raumtemperatur oder für eine Woche bei 4°C inkubiert. Für beide Substanzen konnte unter den gewählten Bedingungen keine Dissoziation des Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine aktive Dissoziation der RT durch MAS 0 und MAS 1 konnte demnach nicht hervorgerufen werden.

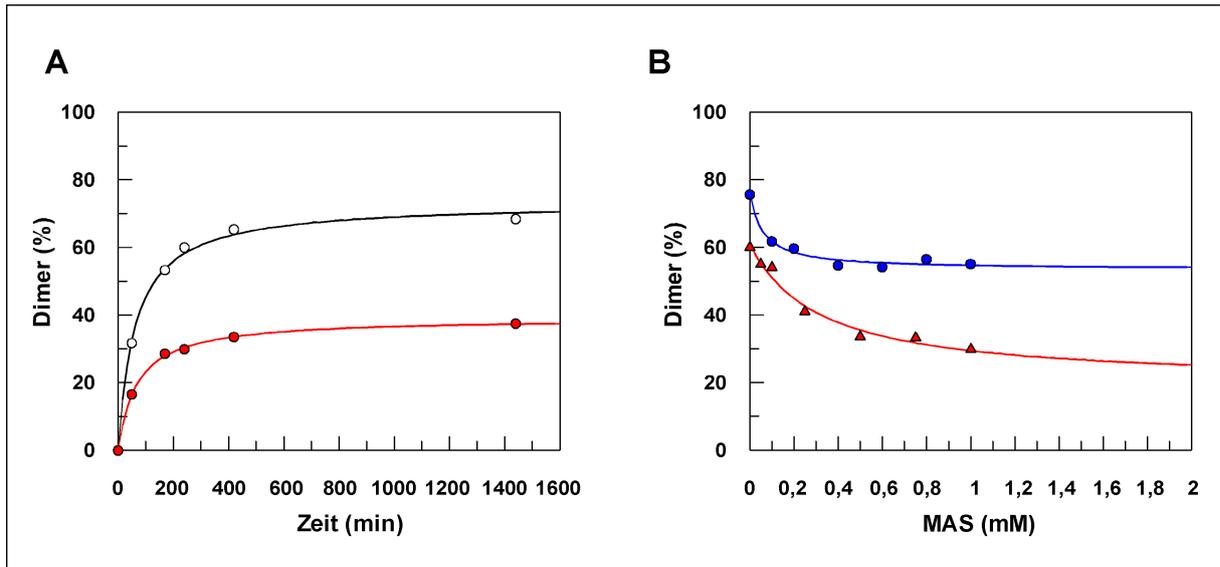


Abbildung 4.13: **Kinetik der Reassoziierung in Anwesenheit von MAS-Substanzen. Konzentrationsabhängigkeit der Reassoziationsinhibition.** **A:** Durch Acetonitril dissoziierte RT wurde 1:15 in Acetonitril-freiem Puffer verdünnt (Endkonzentration $1,27 \mu\text{M}$) und für 0–24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Ansatz wurde 1 mM MAS 1 zugesetzt (rote Linie) oder im Fall der Kontrolle lediglich die äquivalente Menge an DMSO (schwarze Linie). Die Ansätze wurden über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt und der Dimeranteil im Ansatz berechnet. **B:** Die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der Reassoziierung wurde wie unter A beschrieben ausgeführt. Die Ansätze wurden in Anwesenheit von MAS 0 (blaue Linie) oder MAS 1 (rote Linie) für 4 h inkubiert und der Dimeranteil über Gelfiltrationsanalysen bestimmt.

4.2.2.3 Einfluss von MAS 0 und MAS 1 auf die Polymeraseaktivität

Da die Polymeraseaktivität mit dem Dimergehalt der Reversen Transkriptase korreliert [117], war anzunehmen, dass sich die verminderte Dimerbildung in Anwesenheit von MAS 0 und MAS 1 auch auf Ebene der Aktivität des Enzyms nachvollziehen lässt. Um diese Vermutung zu kontrollieren, wurde ein Teil der Reassoziationsansätze in einem

Standard-Polymerasetest eingesetzt. Es ergaben sich RT-Konzentrationen von 450 pM, die Konzentration der jeweiligen MAS-Substanz lag bei 80 μ M.

Wurde die RT in Anwesenheit von MAS 1 reassoziert, konnte im Polymerase-Test keine verringerte Aktivität der so behandelten RT festgestellt werden (Abbildung 4.14). Eine Inkubation des Heterodimers mit MAS 1 rief ebenfalls keine Veränderung der Aktivität hervor. Dies gilt für verschiedene Inkubationszeiten (1, 24 h und 1 Woche), die bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt wurden (Raumtemperatur und 4°C).

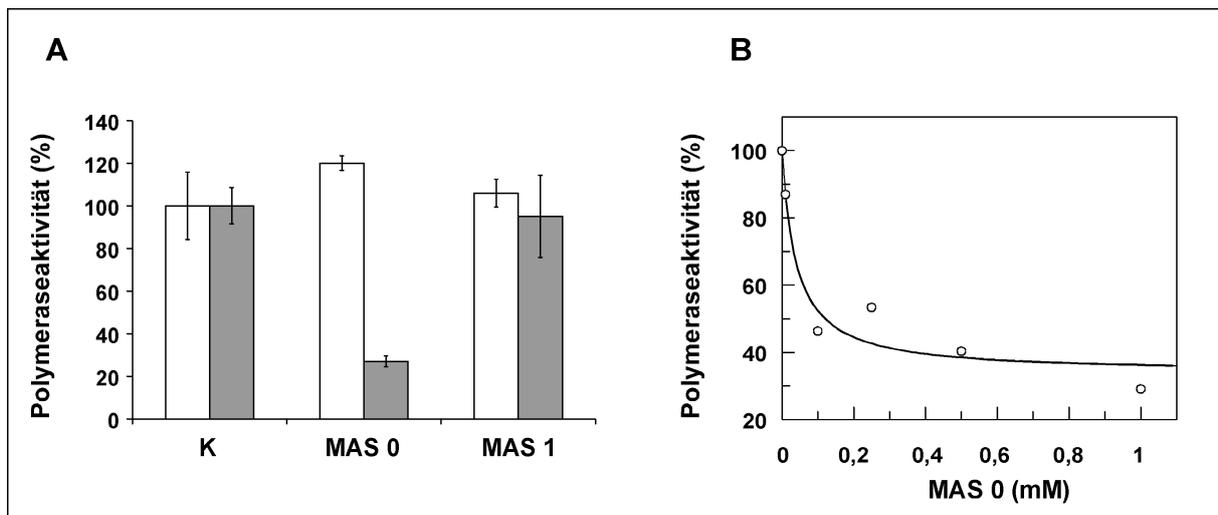


Abbildung 4.14: **Inhibition der Polymeraseaktivität der HIV-1 RT durch MAS-Substanzen.** **A:** Dimere HIV-1 RT (1,27 μ M) wurde vor dem Polymerasetest mit 1 mM MAS 0 inkubiert und für 1 h (weiße Balken) bzw. 24 h (graue Balken) inkubiert. Im Test ergab sich eine RT-Endkonzentration von 450 pM und eine MAS-Endkonzentration von 80 μ M. **B:** Durch Acetonitril dissoziierte RT wurde 1:15 in Acetonitril-freiem Puffer verdünnt und für 16 h inkubiert (Raumtemperatur). Dem Ansatz wurden steigende Konzentrationen an MAS 0 zugesetzt. Die enzymatische Aktivität der reassozierten RT wurde in einem Standard-Polymerasetest überprüft.

Im Gegensatz zu MAS 1 konnte durch MAS 0 eine konzentrationsabhängige Inhibition der Polymeraseaktivität hervorgerufen werden (siehe Abbildung 4.14 B). Die Auswertung der Kurve ergab einen IC_{50} von 39 (\pm 28) μ M, was in guter Übereinstimmung mit dem IC_{50} für die Reassoziationsinhibition steht. Zusätzlich war auch dann eine Inhibition der RT-Aktivität möglich, wenn der Dimeransatz gewählt wurde. Bei Zusatz von 1 mM MAS 0 zur dimeren Form der RT für 1 h zeigte sich keine reduzierte Polymeraseaktivität (siehe Abbildung 4.14 A). Wurde jedoch der gleiche Ansatz nach 24 h einem

Aktivitätstest unterzogen, verringerte sich die enzymatische Aktivität um ca. 70 %. Eine Dissoziation der RT war unter diesen Bedingungen nicht aufgetreten (Daten nicht gezeigt), sodass der Effekt nicht durch den verringerten Dimeranteil zu erklären war. Während einer Inkubation über mehrere Stunden ist es jedoch denkbar, dass MAS 0 - ohne Beeinträchtigung der dimeren Struktur - an die RT bindet und sich somit das Dimergleichgewicht der RT in Anwesenheit von MAS 0 verschiebt. Diese Bindung hat offensichtlich Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität des Proteins.

4.2.2.4 Spezifität der Inhibition der Polymeraseaktivität durch MAS 0

Der Einfluss der MAS-Substanzen auf die Polymeraseaktivität wurde zusätzlich an weiteren Polymerasen getestet. Es wurde die zu 60 % sequenzidentische RT von HIV-2, die RT des lentiviralen EIA-Virus und eine Variante der bakteriellen Polymerase I, das sogenannte Klenow-Fragment (KF), eingesetzt.

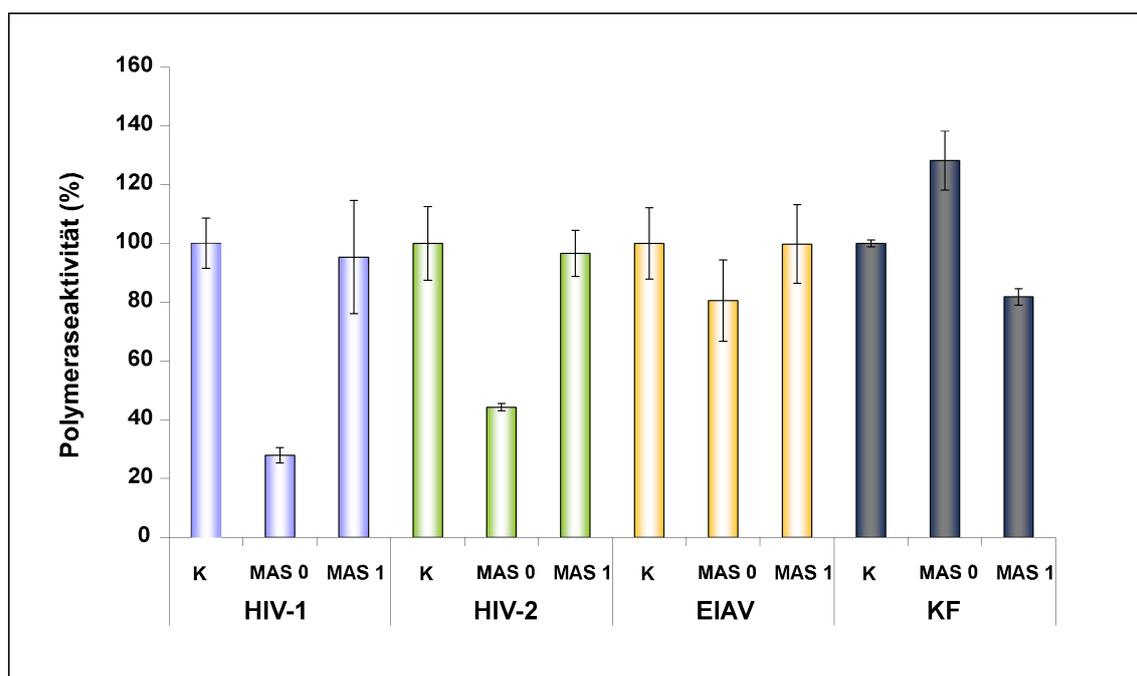


Abbildung 4.15: **Aktivität verschiedener Polymerasen in Anwesenheit von MAS 0 und MAS 1.** Die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität wurde unter Verwendung von p(rA)/o(dT)₁₂₋₁₈ als Template gemessen. Für alle Polymerasen wurde eine Konzentration von 450 pM, für die MAS-Substanzen eine Endkonzentration von 80 μ M im Ansatz gewählt. K: RT mit DMSO inkubiert.

Neben Informationen über die Spezifität, sollten die Experimente auch Aufschluss über die Bedeutung des Tryptophan-Motivs als Zielstruktur geben.

Die Polymerasen wurden, wie bereits beschrieben, in ihrem dimeren Zustand mit den MAS-Substanzen inkubiert. Wurde die Polymeraseaktivität der Proteine nach 1 h gemessen, war keine verringerte Aktivität im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Wurde der Test jedoch nach 24 h durchgeführt, konnte in Anwesenheit von MAS 0 eine verringerte Aktivität der HIV-1 und HIV-2 RT gemessen werden (siehe Abbildung 4.15). Die Aktivität der HIV-1 RT war in Anwesenheit von MAS 0 auf 28 %, die der HIV-2 auf 44 % reduziert. Die Polymeraseaktivität von EIAV und KF war nach Zugabe von MAS 0 nicht beeinflusst. MAS 1 zeigte keinerlei Wirkung auf die RT-Aktivität aller Polymerasen. Ein unspezifischer Inhibitionseffekt durch die MAS-Substanzen konnte bei den ausgewählten Polymerasen nicht gezeigt werden. Stattdessen legen die Ergebnisse den Schluss nahe, dass das in HIV-1 und HIV-2 hochkonservierte Tryptophan-Cluster eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Inhibition durch MAS 0 spielt. Zusätzlich wurde deutlich, dass die durch Computerstudien selektierten Moleküle auch in *in vitro* Experimenten höchstwahrscheinlich an die ausgewählte Zielstruktur binden. Erstmals konnten in dieser Arbeit niedermolekulare Substanzen beschrieben werden, die die Dimerisierung und die enzymatische Aktivität der RT beeinträchtigen.

4.2.3 Inhibition der Dimerisierung durch Nukleinsäuren

Die Idee der Dimerisierungsinhibition wurde auf unterschiedliche Art und Weise in experimentellen Ansätzen umgesetzt. In diesem Abschnitt wird ein kombinatorischer Ansatz beschrieben. Unter Verwendung der SELEX-Technologie (SELEX: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, [150]) sollten Aptamere identifiziert werden, die gezielt an die Dimerisierungsdomäne der p51 Untereinheit binden und die Interaktion mit der p66 UE unterbinden. Nukleinsäuren, die an frei zugängliche Bereiche der p51 UE binden können, wurden über eine Gegenselektion mit dimerer RT abgetrennt. Die verbleibenden RNAs wurde anschließend mit der p51 UE inkubiert und einem Selektionsprozess unterzogen. Die Selektion der Nukleinsäuren und anschließende Klonierungsarbeiten wurden von Frederic Pileur (MPI Dortmund) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden einzelne Sequenzen ausgewählt und auf ihre Bindung an die p51 Untereinheit bzw. die dimere Form der RT getestet. Zum besseren Verständnis werden zunächst einige Ergebnisse bezüglich des Selektionsprozesses aufgeführt.

4.2.3.1 Ergebnisse der *in vitro* Selektion

Für die Selektion wurde eine RNA-Bibliothek eingesetzt, die eine variable Region von 40 nt aufwies. Das verwendete p51-Protein war mit einem Polyhistidin-Etikett versehen, sodass das Protein über Ni-NTA-beschichtete magnetische Agarosekügelchen immobilisiert werden konnte. Diese Technik erlaubte eine einfache Handhabung bei allen Inkubations- und Waschschrritten. Um eine unspezifische Bindung und Amplifikation der eingesetzten RNA an die Ni-NTA-Kügelchen zu umgehen, wurde die RNA mit einer Fraktion der Ni-NTA-Kügelchen vorinkubiert. Der ungebundene Anteil wurde anschließend in die eigentliche Selektion eingeführt. Die Selektion umfasste 9 Runden. In den ersten 7 Runden wurden 6 nmol RNA und 4 nmol Protein inkubiert. Der Anteil der gebundenen RNA stieg von Runde zu Runde exponentiell an. Während in Runde 1 ca. 6 % gebunden vorlagen, steigerte sich der gebundene RNA-Anteil in Runde 7 auf 21 %. In Runde 8 wurde bei gleichbleibender RNA-Menge die eingesetzte Menge an p51 auf 1 nmol, in Runde 9 auf 0,5 nmol reduziert. 16 % der eingeführten RNA in Runde 8 und 14 % der RNA in Runde 9 konnten von p51 eluiert werden.

Der Nukleinsäurepool der Runde 8 und 9 wurde kloniert und 20 Klone pro Runde sequenziert. Die Sequenzen konnten in vier Gruppen aufgeteilt werden, die starke Sequenzähnlichkeiten innerhalb der Gruppe aufwiesen. Pro Gruppe wurde die am häufigsten vertretene Sequenz für weitere Studien ausgewählt (Apt. 8.7: 4 Klone, Apt. 9.2: 4 Klone, Apt. 9.9.: 6 Klone). Da sich die zwei Klone der vierten Gruppe stark in ihrer Sequenz unterschieden und jeweils nur einmal im Pool gefunden wurden, wurden sie nicht in die weiteren Studien miteinbezogen. In Abbildung 4.16 sind die Sequenzen und Strukturen der verwendeten Aptamere aufgeführt. Mit dem Programm *mfold* wurden die Sekundärstrukturen berechnet. Für das Aptamer 9.9 konnte darüber hinaus ein Pseudoknoten als alternative Faltungsmöglichkeit identifiziert werden. Dieses Strukturmotiv kann vom Programm *mfold* nicht erkannt werden.

4.2.3.2 Bindungs- und Inhibitionsstudien für die ausgewählten Aptamere

Die ausgewählten Aptamere 8.7, 9.2 und 9.9 wurden *in vitro* transkribiert, aufgereinigt und radioaktiv markiert. 1 nM der jeweiligen RNA wurde mit steigenden Mengen Protein inkubiert und anschließend ein Filterbindungsassay durchgeführt. Für das Aptamer 8.7 konnte weder für das p51 Protein noch für die RT eine Bindung festgestellt werden. Wie in Abbildung 4.17 A gezeigt, interagierte das Aptamer 9.2 sowohl mit der dimeren Form der RT als auch mit der p51 Untereinheit. Die Bindungskurven wurden mit einer quadratischen Gleichung ausgewertet. Für die Bindung an das Dimer konnte eine Bindungskonstante von $K_d = 446 (\pm 360)$ nM berechnet werden. Die Affinität zur p51

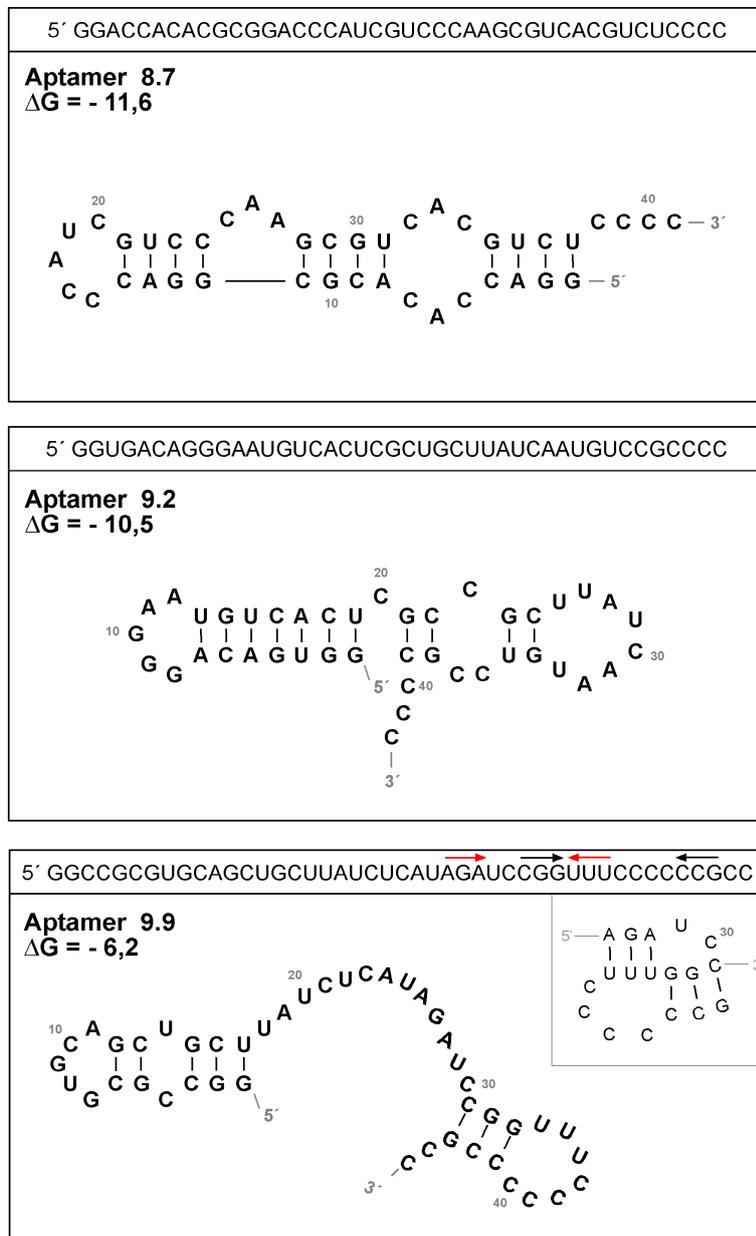


Abbildung 4.16: **Sequenz und Sekundärstruktur ausgewählter Aptamere.** Die gezeigten Aptamere entstammen einem SELEX-Experiment mit der HIV-1 RT p51 Untereinheit als Zielprotein. Gezeigt sind die theoretischen, thermodynamisch stabilsten Strukturen. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm *mfold*. Für das Aptamer 9.9 ist zusätzlich eine mögliche Pseudoknotenstruktur angegeben, die in der Sequenz mit Pfeilen vermerkt ist.

UE war mit einem K_d von $5,16 (\pm 3,88) \mu\text{M}$ um den Faktor 10 geringer. Das Aptamer 9.9 wies ausschließlich eine Bindung an die p51 UE auf, die jedoch mit einem K_d von $2,33 (\pm 1,74) \mu\text{M}$ schwach affin ist. Eine Bindung an die dimere Form der RT konnte nicht beobachtet werden.

Für die Aptamere 9.2 und 9.9 konnte eine schwache Affinität zur p51 UE festgestellt werden. Ob diese Interaktion einen Einfluss auf die Dimerisierung und Polymeraseaktivität der Reversen Transkriptase hat, sollte im Weiteren studiert werden. Die Reverse Transkriptase wurde mit Acetonitril dissoziiert, sodass die p51 UE frei zugänglich war und die Reassoziierung für 16 h bei Raumtemperatur in Anwesenheit des jeweiligen Aptamers durchgeführt (3.4.1.3).

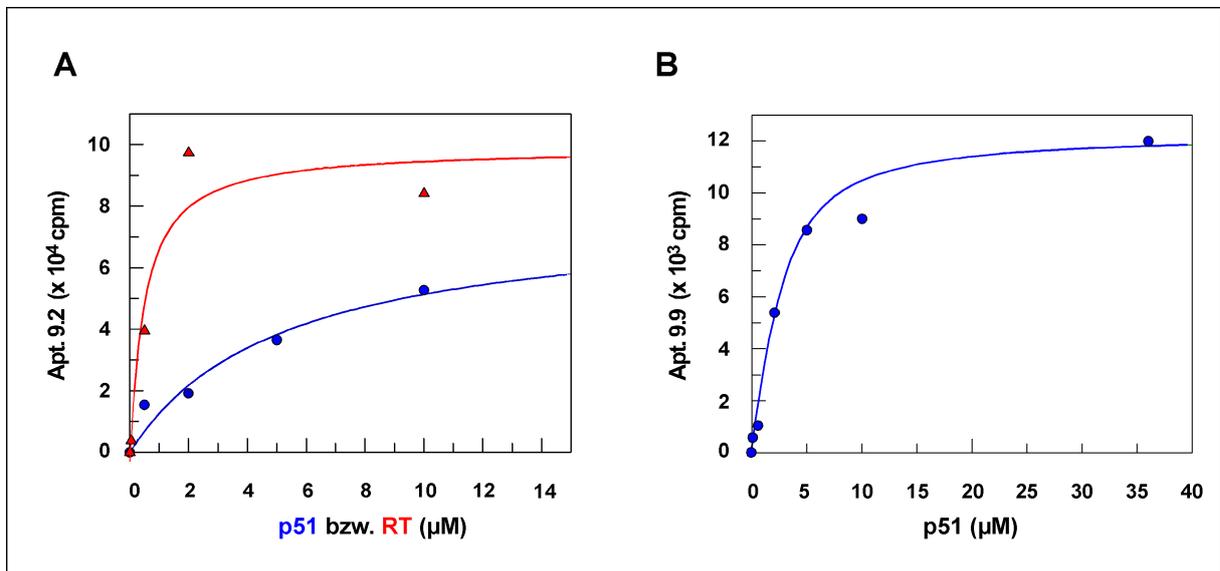


Abbildung 4.17: **Bindung verschiedener radioaktiv markierter RNA-Aptamere an HIV-1 RT bzw. an die p51 UE.** **A:** Die Bindung des Aptamers 9.2 an die dimere Form der HIV-1 RT (rot) bzw. der p51 Untereinheit (blau) wurde über einen Filterbindungsassay bestimmt. Die Auswertung der Kurve mit einer quadratischen Bindungsgleichung ergab für die Bindung an RT einen K_d von $446 (\pm 360) \text{ nM}$, für die p51 Untereinheit $5,16 (\pm 3,88) \mu\text{M}$. **B:** Die Bindung des Aptamers 9.9 an die p51 Untereinheit der HIV-1 RT wurde über einen Filterbindungsassay bestimmt. Die Auswertung der Kurve mit einer quadratischen Bindungsgleichung ergab einen K_d von $2,33 (\pm 1,74) \mu\text{M}$.

Im Ansatz wurde eine RT-Konzentration von 500 nM , für die Aptamere eine Konzentration von 700 nM eingestellt. Der Dimerisierungsgrad des Proteins wurde über Gel-filtrationsanalysen überprüft. Für beide Fälle konnte jedoch keinerlei Monomeranteil

ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund spiegelte sich in der Polymeraseaktivität wieder. Auch hier war keine Änderung im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt).

Die Selektion eines hochaffinen Nukleinsäureliganden für die p51 UE der Reversen Transkriptase war demnach nicht möglich. Im Vergleich zur p66 UE bildet p51 nur wenige Kontakte zu den gebundenen Nukleinsäuren aus und hat eher unterstützende Funktionen. Die geringe Affinität der Nukleinsäuren könnte auf diesen Umstand zurückzuführen sein.

4.2.4 Inhibition der Dimerisierung durch Peptide

Bisher sind vor allem Peptide als Modulatoren der RT-Dimerisierung bekannt. Von der Aminosäuresequenz der Kontaktbereiche wurden die Peptide p7 und PepA abgeleitet [97, 101], die mit einer Affinität im nanomolaren Bereich nicht nur eine Wechselwirkung mit der Reversen Transkriptase eingehen, sondern zusätzlich die Aktivität des Enzyms heruntersetzen. Die Peptide sollen einen alternativen Bindungspartner an Stelle der jeweiligen anderen Untereinheit darstellen.

Für viele RT-Inhibitoren wurde bei Applikation über längere Zeiträume das Auftreten von Mutationen in der RT beobachtet und beschrieben, die eine Resistenz gegenüber dem Inhibitor vermitteln. Viele der Mutationen üben keinen negativen Effekt auf die enzymatische Aktivität aus. Für das Peptid p7 sollte in diesem Zusammenhang überprüft werden, ob die Mutation der Aminosäuren, die den Kontakt zum Peptid vermitteln, eine Veränderung der Enzymaktivitäten der RT hervorruft. Die Daten sollten Aufschluss über die Anwendbarkeit der Peptidstrategie geben.

Ergänzend zu den aufgeführten inhibitorischen Peptiden sollten in dieser Arbeit weitere Peptide getestet werden, die aus den Kontaktbereichen der HIV-1 RT Untereinheiten abgeleitet wurden. Ein möglicher Einfluss der Peptide auf Assoziation und Polymerase- bzw. RNaseH-Aktivität der RT sollte untersucht werden.

4.2.4.1 Mutation der Kontaktstellen des Dimerisierungsinhibitors p7

Als Dimerisierungsinhibitor wurde bereits ein 10-mer Peptid beschrieben [97]. Die Bindungsstelle dieses als p7 bezeichneten Peptids wurde mittlerweile aufgeklärt [29]. Es konnte gezeigt werden, dass das Peptid vorrangig mit den Aminosäuren W24 und F61 in der p51 Untereinheit interagiert. Denkbar ist, dass diese Positionen bei einer Resistenzentwicklung mutiert vorliegen. Daher wurden die Positionen W24 und F61 separat in der jeweiligen UE oder in beiden UE (Doppelmutante, DM) gegen ein Glycin ausgetauscht, um die Auswirkungen der Mutationen auf die Polymerase- und RNaseH-Aktivität des

Enzyms nachzuvollziehen. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen des TRIOH-EU-Projektes in Zusammenarbeit mit Gilles Divita (CNRS Montpellier) durchgeführt, der die bereits mutierten Proteine zur Verfügung stellte.

Die Reinheit und Homogenität der RT-Präparationen wurden über eine Gelfiltrationsanalyse geprüft. Dabei stellte sich heraus, dass einzelne RT-Mutanten monomere Anteile aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Der Dimergehalt der Mutante p51^{WT}/p66^{DM} lag beispielsweise bei 57,7%, der der Mutante p51^{DM}/p66^{WT} bei 51%. Die Protein-Präparationen wurden auf Grundlage der berechneten Konzentrationen in den Tests eingesetzt und der Dimergehalt bei der späteren Berechnung der Aktivitäten berücksichtigt.

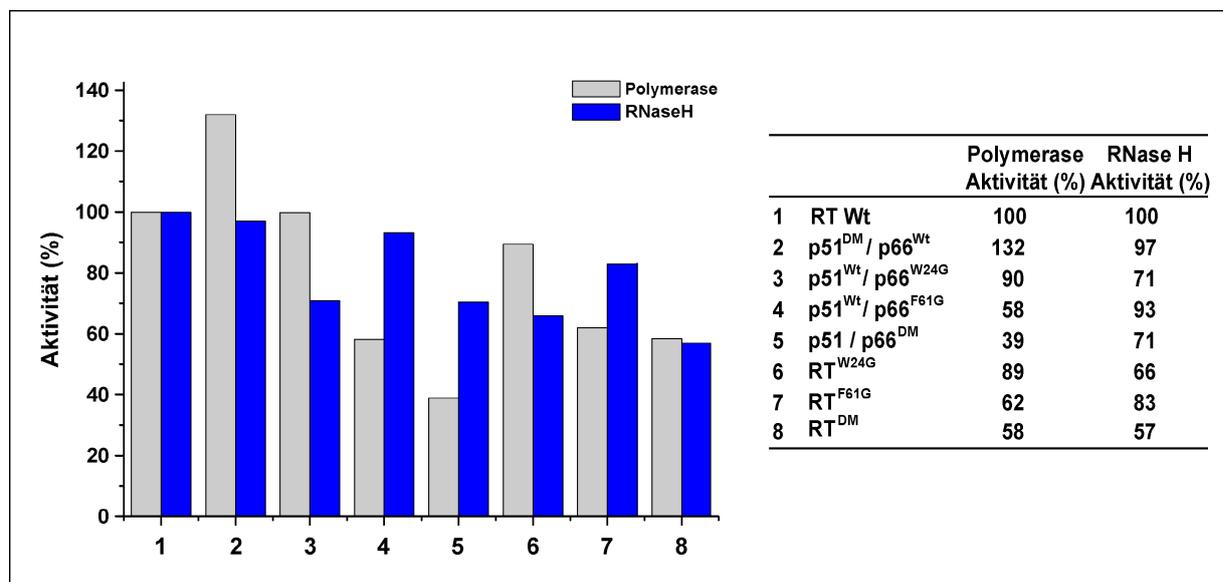


Abbildung 4.18: **Polymerase- und RNaseH-Aktivität der verschiedenen RT-Mutanten.** Die Polymeraseaktivität der Enzyme (440 nM) wurde in einem Standard-Polymerasetest überprüft. Die RNaseH-Aktivität der Protein wurde über den Abbau des radioaktiv markierten RNA-Stranges eines DNA/RNA-Hybrids über die Zeit verfolgt. Die Auswertung der Daten erfolgte über eine einfach exponentielle Gleichung. DM: Doppelmutante (W24G und F61G).

Die enzymatische Aktivität der Proteine wurden in einem Standard-Polymerasetest überprüft. Wie in Abbildung 4.18 dargestellt, wirkte sich eine Mutation an Position F61 in der p66 UE negativ auf die Polymeraseaktivität des Enzyms aus (p51/p66^{F61G}: 58%). Wurde zusätzlich die Position W24 mutiert, reduzierte sich die Aktivität auf 39%. Die Doppelmutation in der p51 Untereinheit führte dagegen zu einer Steigerung der DNA-Polymeraseaktivität (132%).

Die RNaseH-Aktivität wurde durch einen Aminosäureaustausch an Position 24 der p66 Untereinheit verringert. Wurde die RT mit Aminosäureaustausch an Position 24 alleine oder in Kombination mit der Mutation der Position 61 getestet, erfolgte in beiden Fällen eine Reduktion auf 70 %. Für die RNaseH-Aktivität konnte demnach kein additiver Effekt der Mutationen beobachtet werden.

Dabei ist zu beachten, dass im Virus p51 aus der p66 Untereinheit hervorgeht und damit alle in p66 vorhandenen Mutationen auch in p51 wiederzufinden wären. Eine Resistenzentwicklung gegenüber p7 würde daher zu einer reduzierten enzymatischen Aktivität der RT führen und damit voraussichtlich die Replikationsfähigkeit derartiger Viren beeinträchtigen.

4.2.4.2 Peptide abgeleitet von der Verbindungsdomäne

Abgeleitet von der Verbindungsdomäne wurden zwei Peptidfamilien synthetisiert, die als kompetitive Binder zur p51 UE wirken sollten. Die Sequenzen beider Familien entsprechen den Aminosäuren 404–411. Die Peptide P1–P5 der ersten Familie entsprechen den Aminosäuren, die sich C-Terminal an die p7 Sequenz anschließen. Es wurden Peptide unterschiedlicher Länge (7-, 8- und 9-mer) innerhalb der Sequenz ausgewählt. Die Peptide wurden freundlicherweise von Eliane Schweizer (ETH Zürich) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Um den Einfluss der Peptide auf die Redimerisierung der RT zu untersuchen, wurde, wie schon zuvor beschrieben, ein Reassoziationsexperiment gewählt (3.4.1.3). Monomere Anteile im Reassoziationsansatz sollten über Gelfiltrations-Experimente identifiziert werden. Nach einer ü.N. Inkubation der Reassoziationsansätze in Anwesenheit des jeweiligen Peptids bei Raumtemperatur wurde ausschließlich dimeres Protein wiedergefunden (Daten nicht gezeigt). Ergänzend zu den Gelfiltrationsanalysen wurde ein Teil der Reassoziationsansätze im Standard-Polymerasetest überprüft. Würden die Peptide binden, ohne jedoch eine Dimerisierung der UE zu unterbinden, könnte diese Bindung u. U. über eine Beeinflussung der Polymeraseaktivität festgestellt werden. Wie in Teil A der Abbildung 4.19 dargestellt, zeigte jedoch keines der Peptide einen inhibitorischen Effekt. Als Positivkontrolle wurde der monoklonale Antikörper 9 mitgeführt, der, wie frühere Studien zeigten [116], die Dimerisierung der Untereinheiten unterbindet. In Anwesenheit von MAb9 wurde eine drastisch reduzierte RT-Aktivität gemessen, da die Reverse Transkriptase nur als Dimer aktiv ist. Alle getesteten Peptide dieser Familie erwiesen sich damit hinsichtlich ihrer Funktion als Dimerisierungsinhibitoren als nicht aktiv.

Die zweite getestete Peptidfamilie (ESP-Peptide) umfasste fünf unterschiedliche 6-mer (siehe Abb. 4.19 B). Das im Wildtyp vorhandene Alanin am N-Terminus der Sequenz

wurde gegen die Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin ausgetauscht. Auch in diesen Studien wurde wie zuvor ein Reassoziationsansatz gewählt, um eine Bindung der Peptide über eine Modulation des Dimerisierungsgrades bzw. der Polymeraseaktivität ausmachen zu können.

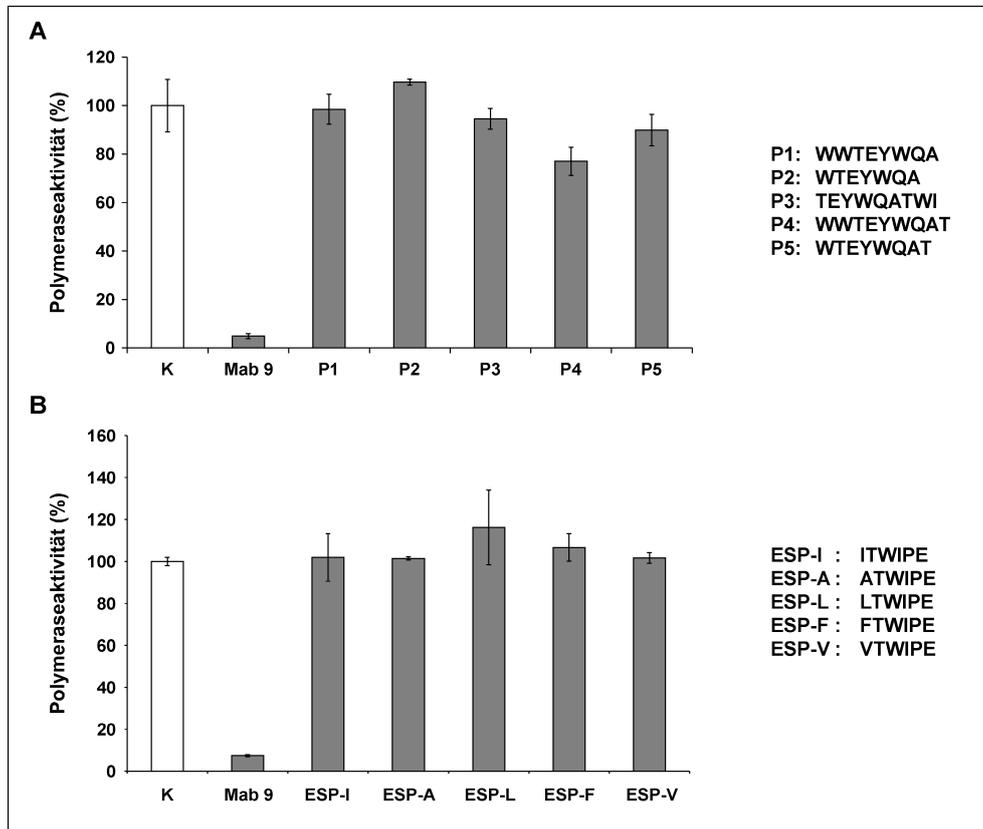


Abbildung 4.19: **Einfluss verschiedener Peptide auf die Polymeraseaktivität der Reversen Transkriptase.** Durch Acetonitril dissoziierte RT wurde 1:10 in Acetonitril-freiem Puffer in Anwesenheit von Peptiden inkubiert. Die enzymatische Aktivität der reassozierten RT wurde in einem Standard-Polymerasetest überprüft. Als Kontrolle diente RT ohne Zusatz eines Peptids und ein Ansatz in Anwesenheit des monoklonalen Antikörpers 9, der die Dimerisierung der RT inhibiert. Die Konzentration der Peptide P1–P5 (**A**) betrug $2 \mu\text{M}$, die der ESP-Peptide (**B**) 5 mM . Die RT-Konzentrationen betragen 10 nM (**A**) bzw. 81 pM (**B**).

In Abbildung 4.19 B ist das Ergebnis eines Polymerasetests in Anwesenheit von 5 mM Peptid gezeigt. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptid ist keine reduzierte enzymatische Aktivität der reassozierten RT zu verzeichnen. Auch hier ist eine deutliche Aktivitätsreduktion durch die Positivkontrolle MAb9 sichtbar. Die parallel durchgeführten Gelfiltrationsanalysen ließen keine Verringerung des Dimergehalts nach Reassoziierung

erkennen, sodass auch bei dieser Peptidfamilie davon ausgegangen werden muss, dass keine Bindung der Peptide an die p51 UE bzw. die dimere Form der RT stattfindet.

4.2.4.3 Von der RNaseH-Domäne der RT abgeleitete Peptide

Die momentan in Anwendung befindlichen RT-Inhibitoren zielen allesamt auf die Polymerase-Aktivität des Enzyms. Die RT verfügt darüber hinaus über eine weitere katalytische Funktion, die RNaseH-Aktivität. Die RNaseH-Domäne der p66 Untereinheit geht Wechselwirkungen mit der p51 Untereinheit ein. Diese Interaktion trägt entscheidend zur Stabilität und Funktion des Enzyms bei. Binden Antikörper in diesem Proteinbereich wird die RNaseH-Aktivität drastisch reduziert [116].

In diesem Zusammenhang wurden von der RT-Aminosäuresequenz abgeleitete Peptide entworfen, die die Interaktion der beiden Untereinheiten minimieren und einen inhibitorischen Effekt auf die RNaseH-Aktivität ausüben sollten. Um den Interaktionsbereich vollständig abzudecken, wurden zwei Peptidsequenzen TR-1 und TR-2 gewählt, die partiell in ihrer Sequenz überlappen (Aminosäureposition 534–554 in der p66 UE).

Die Reverse Transkriptase wurde monomerisiert, damit eine Bindung der Peptide an die p51 UE möglich wurde. Der für die Reassoziationsansatz verwendete Verdünnungspuffer wurde mit 10 μ M Peptid versetzt und der Reassoziationsansatz für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Anteil an monomerer bzw. dimerer RT wurde über einen Gelfiltrationslauf analysiert. In Anwesenheit der Peptide war jedoch kein reduzierter Dimergehalt festzustellen (Daten nicht gezeigt). Im Polymerasetest konnte in Gegenwart der Peptide keine verringerte Aktivität des Enzyms gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Da eine Wechselwirkung der Peptide mit der p51 UE die Interaktion mit der RNaseH-Domäne beeinflussen könnte, wurde zusätzlich zur Polymerase- auch die RNaseH-Aktivität der RT überprüft. In Abbildung 4.20 ist das Ergebnis des RNaseH-Tests gezeigt. Der Abbau des 35 nt langen RNA-Strangs eines DNA/RNA-Hybrids wurde über die Zeit verfolgt. Im Vergleich zum Ansatz ohne Peptid ist keine Veränderung im Zeitverlauf der Reaktion oder im Spaltungsmuster zu erkennen. Diese Ergebnisse legen, wie schon bei den von der Verbindungsdomäne abgeleiteten Peptiden, den Schluss nahe, dass die TR-Peptide aufgrund einer fehlenden Bindung an die RT deren Dimerisierungsgrad und enzymatische Eigenschaften nicht beeinflussen.

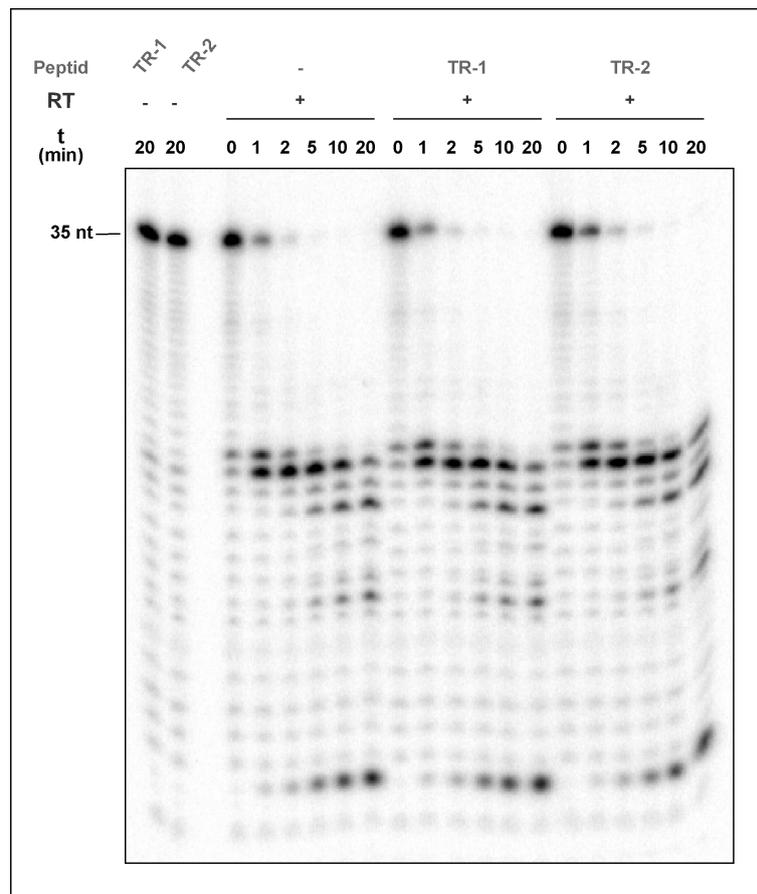


Abbildung 4.20: **RNaseH Aktivitätstest in Anwesenheit der Peptide TR-1 und TR-2.** Der Abbau des radioaktiv markierten RNA-Stranges eines DNA/RNA-Hybrids in Anwesenheit von RT (20 nM) und verschiedenen Peptiden (10 μ M) wurde über die Zeit verfolgt. Zur Kontrolle wurde das Hybrid lediglich in Anwesenheit der Peptide für 20 min inkubiert. Die Proben wurden in einem 12%igen denaturierendem PAA-Gel aufgetrennt.

4.3 Nukleinsäureinhibitoren

Die Reverse Transkriptase ist ein Nukleinsäure-bindendes Protein, das im viralen Lebenszyklus sowohl mit einzel- als auch mit doppelsträngigen Nukleinsäuren (RNA, DNA und RNA/DNA und DNA/DNA-Hybride) interagiert. Daher lag es nahe, Oligonukleotide als Inhibitoren einzusetzen, die mit dem natürlichen Substrat der RT um die Nukleinsäurebindungsstelle konkurrieren bzw. einen überlappenden Bindungsbereich einnehmen und die Bindung des Substrats verhindern. Ein solcher Inhibitor wurde erstmals von Tuerk und Gold im Jahr 1992 beschrieben [151]. Die von den Autoren angewendete und zuvor beschriebene Methode der *in vitro* Selektion [150] ermöglichte die Identifizierung

von spezifischen RT-Bindungspartnern aus einer Nukleinsäurebibliothek von 10^{14} – 10^{15} verschiedenen Molekülen. Die selektierten Ribonukleinsäuren wiesen alle ein einheitliches Sekundärstrukturmotiv auf, die sogenannte RNA-Pseudoknotenstruktur. Das aus diesem Selektionsprozess als bester Binder hervorgegangene Aptamer wurde seitdem als Pseudoknoten bezeichnet und wurde in seinen Bindungseigenschaften bereits näher charakterisiert [67, 76]. Von Schneider *et al.* wurde eine weitere Selektion mit der RT als Zielprotein durchgeführt. Allerdings wurde eine DNA-Bibliothek eingesetzt. Als bester Binder wurde das DNA-Aptamer RT1t49 selektiert [136]. Aptamere gehen zahlreiche Interaktionen mit dem Zielprotein ein, die sich über eine große Bindungsfläche erstrecken. Das Aufkommen von multiplen Resistenzmutationen ohne eine gleichzeitige Beeinträchtigung der enzymatischen Eigenschaften der RT scheint daher unwahrscheinlich. Aus diesem Grund stellen Aptamere eine interessante alternative Inhibitor-Klasse dar.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob RNA- und DNA-Aptamere RT-Mutanten binden können, die resistent gegen die vielfach genutzten nukleosidischen Inhibitoren AZT und 3TC sind. Die Charakterisierung der Bindung schloss Inhibitionsstudien mit der Wildtyp-Form der RT und NRTI-resistenten Mutanten ein. Darüber hinaus sollte das Konzept eines substratähnlichen Inhibitors am Beispiel der RNA 7.7 überprüft werden (siehe Abschnitt 4.3.1).

4.3.1 Bindungseigenschaften ausgewählter Nukleinsäureinhibitoren

Zunächst wurden die Bindungseigenschaften der gewählten Nukleinsäuren gegenüber wildtypischer RT bestimmt. Die Ergebnisse sollten als Vergleichswerte für die späteren Messungen mit den RT-Mutanten herangezogen werden.

Die Affinität der 33 nt langen Pseudoknoten-RNA, deren Struktur in Abbildung 4.21 A dargestellt ist, zur RT wurde über einen Filterbindungsassay bestimmt (vgl. 3.4.2). Die RNA wurde an ihrem 5'-Ende radioaktiv markiert, sodass der Anteil der im Komplex mit der RT vorliegenden RNA nach Immobilisierung auf einem Nitrozellulosefilter über Szintillationsmessungen möglich war. Nach Auswertung der Daten mit einer quadratischen Gleichung ergab sich ein K_d von $44 (\pm 7)$ pM (siehe Abb. 4.21 B). Dieser Wert steht in sehr guter Übereinstimmung mit Messungen von Kensch *et al.* [76]. Die ebenfalls über einen Filterbindungsassay bestimmte Dissoziationskonstante betrug 44 pM. Zusätzliche fluoreszenzspektroskopische Methoden ergaben einen K_d von 25 pM. Über den direkten Vergleich mit den bereits veröffentlichten Daten konnte die Zuverlässigkeit der Methode, die experimentellen Bedingungen und die Qualität des rekombinanten Proteins kontrolliert werden. Da die ermittelten Affinitäten mit den Werten von Kensch

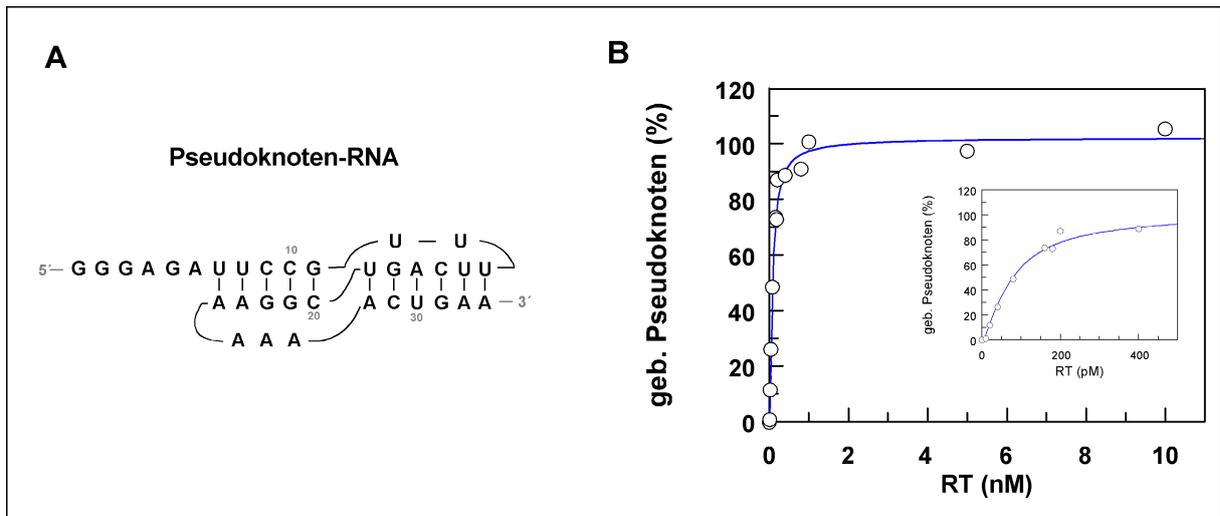


Abbildung 4.21: **Affinität radioaktiv markierter Pseudoknoten-RNA zur HIV-1 RT.** **A:** Sekundärstruktur der Pseudoknoten-RNA. **B:** Die über einen Filterbindungsassay gemessene Bindungskurve der Pseudoknoten-RNA (100 pM) an die HIV-1 RT^{WT}. Die Auswertung der Kurve mit einer quadratischen Bindungsgleichung ergab einen K_d von $44 (\pm 7)$ pM.

et al. übereinstimmten, schien eine vergleichende Analyse mit den mutierten RTs unter den gewählten Bedingungen möglich zu sein.

Die radioaktive Endmarkierung des Aptamers RT1t49 war nur unzureichend möglich. Daher wurde für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten die Methode der Verdrängungstitration eingesetzt (3.4.6.1). Ein vorgeformter Komplex aus einem FAM-markierten 18/36-mer DNA/DNA Substrat (25 nM) und RT (45 nM) wurde mit steigenden Mengen unmarkierter RT1t49 DNA titriert. Das Ergebnis der Verdrängungstitration ist in Abbildung 4.22 B dargestellt. Die Auswertung der Titration erfolgte über ein iteratives Verfahren unter Verwendung des Programms *Scientist*, dem das im Anhang aufgeführten Modell zugrunde liegt. Dabei konnte für die RT1t49-RT-Interaktion ein K_d von 123 pM ermittelt werden. Die von Schneider *et al.* bestimmte Bindungsaffinität lag mit 1 nM um Faktor 10 höher [136]. Über das hier verwendete Verfahren konnte jedoch gezeigt werden, dass das DNA-Aptamer einen ähnlich stabilen Komplex mit der RT ausbilden kann, wie die hochaffine Pseudoknoten-RNA. In Abbildung 4.22 A ist die von den Autoren veröffentlichte Sekundärstruktur der DNA dargestellt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde außerdem die verkürzte Version des Aptamers (RT1t33) genutzt, dessen Sequenz in grünen Buchstaben hervorgehoben ist.

Als dritte Nukleinsäure wurde die RNA 7.7 in die Studien einbezogen. Diese RNA

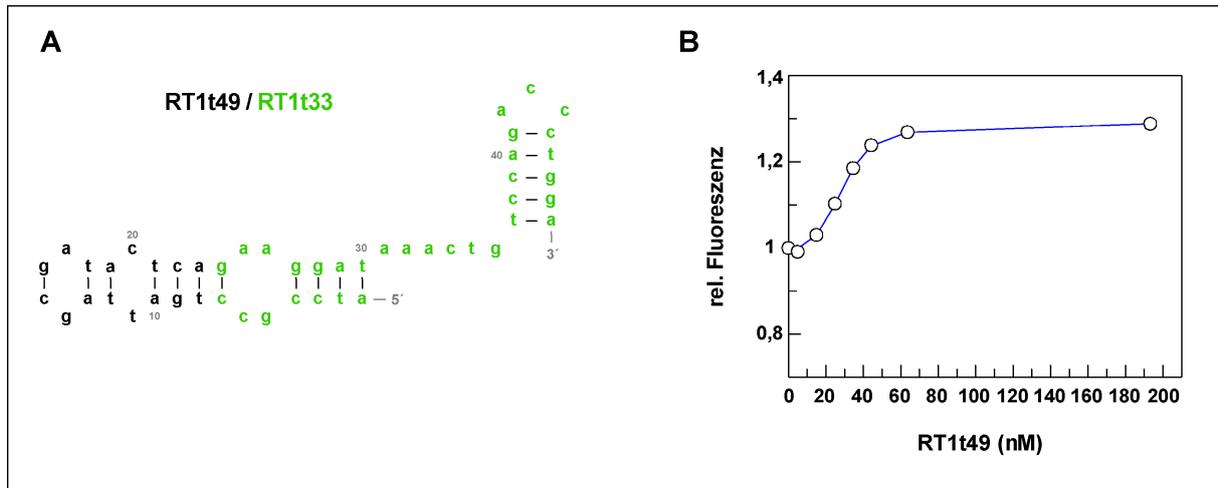


Abbildung 4.22: **Affinität des Aptamers RT1t49 zur HIV-1 RT.** Sekundärstruktur des Aptamers RT1t49. In grün ist die Sequenz des verkürzten Aptameres RT1t33 dargestellt. **B:** Die Affinität des DNA-Aptamers wurde über eine Verdrängungstitration bestimmt. Einem Komplex aus FAM-markierten 18/36-mer DNA/DNA Substrat (25 nM) und HIV-1 RT^{WT} (45 nM) wurde das DNA-Aptamer RT1t49 als Kompetitor in steigenden Konzentrationen zutitriert. Die Kurve wurde mithilfe des Programms *Scientist* über ein iteratives Verfahren ausgewertet. Es ergab sich ein K_d von 123 pM.

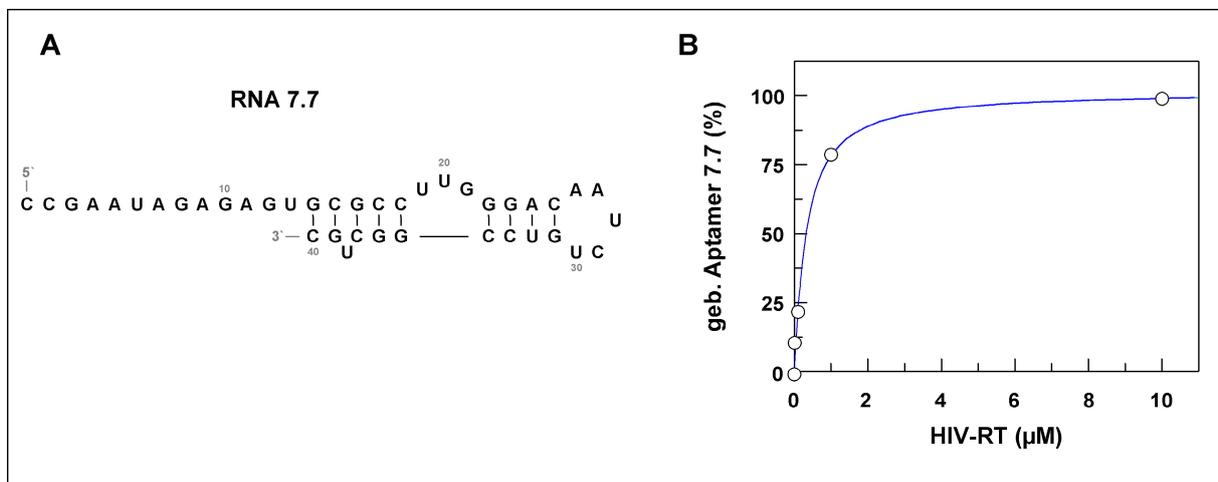


Abbildung 4.23: **Affinität der RNA 7.7 zur HIV-1 Reversen Transkriptase.** In Teil **A** ist die Sekundärstruktur der RNA 7.7 gezeigt. **B:** Die Affinität der RNA zur RT wurde über einen Filterbindungsassay bestimmt. Die Auswertung der Kurve erfolgte über eine quadratische Bindungsgleichung und ergab einen K_d von 275 (\pm 183) nM.

stammte aus einer *in vitro* Selektion mit dem Luziferase-Protein als Zielmolekül, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Die variable Region der Nukleinsäurebibliothek umfasste 40 nt. Die in diesem Zusammenhang klonierten Nukleinsäuren wurden sequenziert und anschließend die Sekundärstrukturen mit dem Programm *mfold* berechnet. Die Nukleinsäuren zeigten keine Bindung an das Luziferaseprotein. Ein ähnlich negatives Selektionsergebnis berichtete die Firma NascaCell, München, (persönliche Mitteilung), sodass die Vermutung nahe lag, dass das Luziferase-Protein kein geeignetes Zielmolekül für einen *in vitro* Selektionsprozess darstellt.

Viele der selektionierten RNAs wiesen allerdings - wie auch schon die gegen die p51 UE selektionierten Aptamere (4.2.3) - eine Primer/Template-ähnliche Sekundärstruktur auf (siehe Abbildung 4.23). Aufgrund dieser Ähnlichkeit zum Substrat der Reversen Transkriptase wurden die Bindungs- und Inhibitionseigenschaften der RNA 7.7 in Verbindung mit der RT ebenfalls untersucht. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden ebenfalls der Filterbindungsassay herangezogen. Auf diese Weise konnte eine Affinität von 275 (\pm 183) nM berechnet werden.

4.3.2 Charakterisierung der Inhibition der enzymatischen Aktivitäten der RT durch Nukleinsäuren

In einem Standard-RT-Assay (vgl. 3.4.3) wurde die Inhibitionsfähigkeit der Pseudoknoten-RNA, des DNA Aptamers RT1t49 und der RNA 7.7 überprüft. Die Nukleinsäuren wurden in $1 \times$ RT-Assay-Puffer verdünnt und für 10 Minuten mit der Reversen Transkriptase vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Protein-Nukleinsäurekomplexes zum Reaktionsgemisch gestartet und der Ansatz für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. In Abbildung 4.24 A ist die Inhibition der Polymeraseaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Nukleinsäure dargestellt. Zur Berechnung des IC_{50} -Wertes wurde eine hyperbolische Gleichung genutzt. Für die Pseudoknoten-RNA wurde ein IC_{50} von 4 (\pm 0,5) nM, für das Aptamer RT1t49 von 8 (\pm 1,6) nM und für die RNA 7.7 ein IC_{50} von 310 (\pm 80) nM ermittelt. Die IC_{50} -Werte spiegeln die unterschiedlichen Affinitäten zwischen Nukleinsäuren und RT wieder. Wie erwähnt, wurde die DNA RT1t33 - eine verkürzte Version des Aptamers RT1t49 - in die Inhibitionsstudien eingeschlossen. Für die *in vivo* Anwendung sind kurzkettige Nukleinsäuren von großem Interesse, da sie kostengünstig zu synthetisieren und leichter zu applizieren sind. Daher sollte überprüft werden, ob die verkürzte Version ein vergleichbares inhibitorisches Potenzial wie die komplette RT1t49 Sequenz aufweist. Während für RT1t49 im Standard-RT-Assay ein IC_{50} von 8 nM gemessen werden konnte, konnte die RT-Aktivität mit RT1t33 auch bei hohen Konzentrationen (8 μ M) nur um 30 % reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Ei-

ne Verkürzung führt demnach zu einem teilweisen Verlust der Inhibitionseigenschaften. Die dreidimensionale Faltung der Nukleinsäure und die spezifische Interaktion zwischen einzelnen Aminosäuren und Nukleinsäuren scheint damit unabdingbar für eine effiziente Wechselwirkung.

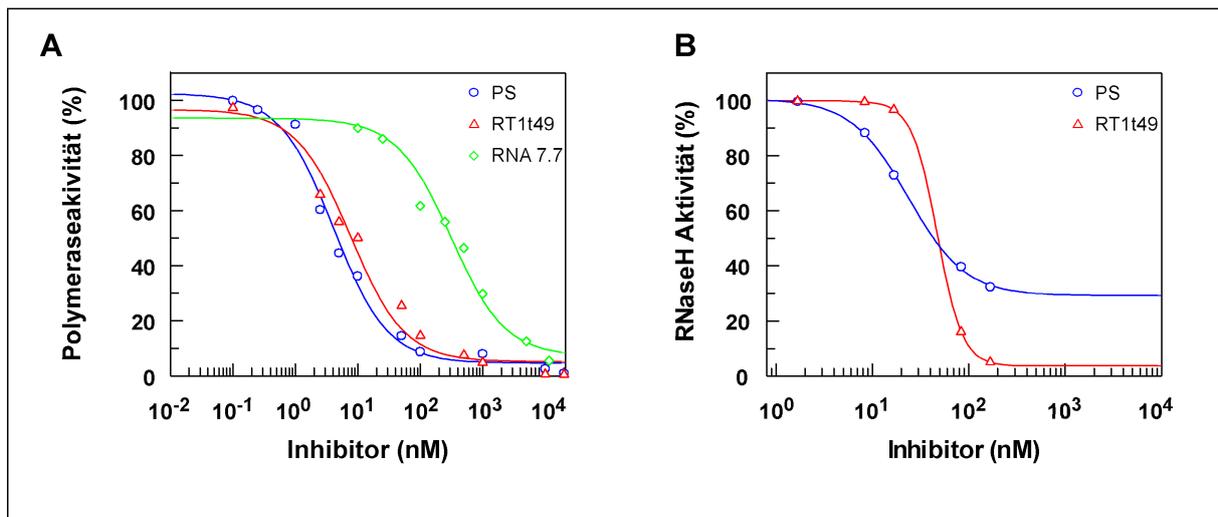


Abbildung 4.24: **Inhibition der Polymerase- und RNaseH-Aktivität der HIV-1 Reversen Transkriptase durch Nukleinsäuren.** Die HIV-1 RT^{WT} (14 nM) wurde mit den verschiedenen inhibitorischen Nukleinsäuren vorinkubiert (Kreise, blau: Pseudoknoten-RNA (PS), Dreiecke, rot: RT1t49-DNA (RT1t49), Rauten, grün: RNA 7.7). **A:** Die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität wurde unter Verwendung von p(rA)/o(dT)₁₂₋₁₈ als Template gemessen. Die Inhibitionskurven wurden mit einer hyperbolischen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende IC₅₀-Werte: PS: 4 (± 0,5) nM; RT1t49: 8 (± 1,6) nM; RNA 7.7: 310 (± 80) nM. **B:** Die RNaseH-Aktivität wurde über den Abbau eines radioaktiv markierten RNA-Stranges eines DNA/RNA-Hybrids (20 nM) nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C bestimmt. Die eingesetzte RT-Konzentration betrug 20 nM. Die Hemmung der RNaseH-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors wurde mit einer hyperbolischen Gleichung ausgewertet und ergab für die Inhibition durch die PS-RNA einen IC₅₀ von 23 (± 2) nM, für die RT1t49 vermittelte Inhibition einen IC₅₀ von 46 (± 0,1) nM.

Für die RNA 7.7 wurden zusätzlich einige Untersuchungen zur Spezifität der Inhibition durchgeführt (Daten nicht gezeigt), die für den Pseudoknoten und RT1t49 bereits veröffentlicht waren. So wurden die Aktivität der HIV-1 RT und der RT des AM-Virus

in Anwesenheit der RNA 7.7 im Standard-Polymerase-Test miteinbezogen. Die nahe verwandte HIV-2 RT konnte - wenn auch in einem geringeren Maße - durch die Anwesenheit der RNA gehemmt werden. Die Aktivität der AMV-RT war jedoch nicht beeinträchtigt. In die Untersuchungen zur inhibitorischen Funktion der Nukleinsäuren wurden neben der Polymeraseaktivität auch die RNaseH-Aktivität der RT einbezogen. Die Aktivität des Enzyms (20 nM) konnte über den Abbau eines 35 nt langen RNA-Stranges aus einem RNA/DNA-Hybrid (20 nM) verfolgt werden. Die Daten wurden mit einer hyperbolischen Gleichung ausgewertet. Bei einer Pseudoknoten-Konzentration von $23 (\pm 2)$ nM wurde die halbmaximale Inhibition der RNaseH-Aktivität erreicht (4.24 B). Ähnliche Ergebnisse wurden für das Aptamer RT1t49 erzielt ($IC_{50} = 46 (\pm 0,1)$ nM). Die halbmaximale Inhibition der RNaseH-Aktivität tritt im Vergleich zur Polymeraseaktivität bei einer etwa 10fach geringeren Inhibitor-Konzentration ein.

Die Daten für die RNA 7.7 wurden nicht aufgeführt, da die Inhibition der RNaseH-Aktivität bei hohen Konzentrationen zwar vorhanden, aber mit hohen Schwankungen verbunden war. Die RNaseH-Aktivität der RT konnte nach Inkubation mit der RNA 7.7 lediglich auf ca. 70 % reduziert werden.

4.3.3 Wechselwirkung von Nukleinsäureinhibitoren mit NRTI-resistenten RT-Mutanten

Wie erwähnt, ist es von großem Interesse RT-Inhibitoren zu entwickeln, deren inhibitorisches Potenzial NNRTI- bzw. NRTI-resistenten RT-Varianten gegenüber erhalten bleibt. Daher wurde die Affinität und Inhibitionsfähigkeit der Aptamere gegenüber RT-Mutanten getestet, die durch spezifische Aminosäureaustausche nicht mehr auf die nukleosidischen Inhibitoren ddI, AZT und 3TC ansprechen (ddI-Resistenz: Mutation L74V; 3TC-Resistenz: M184V; AZT-Resistenz (Vollmutante): M41L, D67N, K70R, T215Y, K219Q; AZT/3TC-Resistenz: AZT-Vollmutante + M184V). Die verwendeten Mutanten wurden von Ruth Krebs im Rahmen ihrer Doktorarbeit in rekombinanter Form aufgereinigt [81] und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Da in vielen Fällen gezeigt wurde, dass Mutationen innerhalb der RT-Sequenz einen Einfluss auf Nukleinsäurebindung, Aktivität und Dimerisierungsverhalten des Proteins ausüben können [159], wurden die verwendeten Mutanten zunächst hinsichtlich dieser Eigenschaften untersucht. Mithilfe der Gelfiltrationsanalyse wurde überprüft, ob die Proteine vollständig als Dimer vorlagen. In allen Fällen wurde der dimere Anteil auf ≥ 99 % bestimmt (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 4.25 A dargestellt, ist die Polymeraseaktivität im Vergleich zur Wildtyp-RT nicht verändert (gemessen im Standard-RT-Test). Zusätzlich wurde die Fähigkeit zur Bindung eines 18/36-mer DNA/DNA-Substrats über Fluoreszenzmessungen gete-

stet. Bei Bindung der Reversen Transkriptase an das Substrat nimmt die Fluoreszenz des mit dem Primer-Molekül verbundenen FAM-Fluorophors ab. Für die RT-Mutante M184V ist eine exemplarische Bindungskurve in Abbildung 4.25 B gezeigt. Die Auswertung erfolgte auch hier mit einer quadratischen Bindungsgleichung und ergab einen K_d von 1,5 nM.

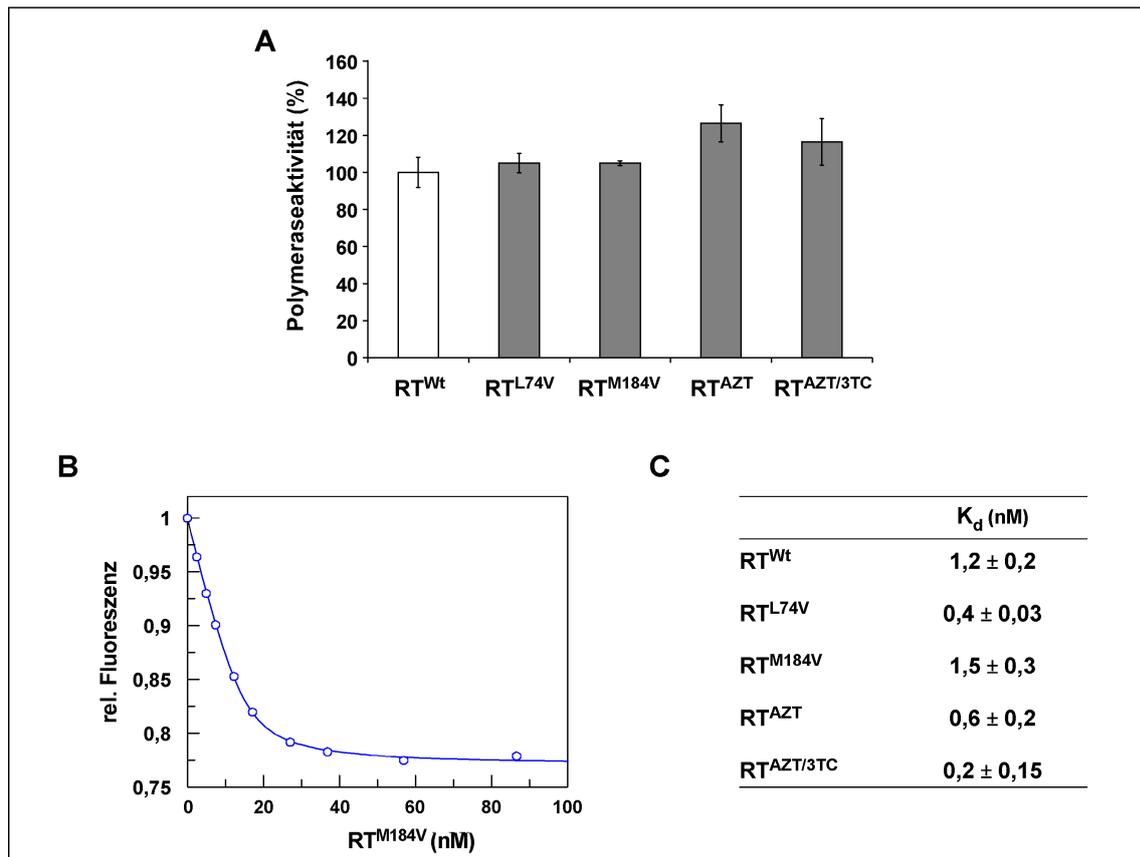


Abbildung 4.25: **Charakterisierung der HIV-1 RT Mutanten.** **A:** Vergleichende Analyse der RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität. Die finale RT-Konzentration betrug 100 nM. **B:** Die Affinität eines 18/36-mer DNA/DNA (25 nM) Substrats zur Reversen Transkriptase (exemplarisch für die RT^{M184V} gezeigt) wurde über eine Gleichgewichtsfluoreszenztitration bestimmt. Die Ausbildung des Komplexes konnte über die abnehmende Fluoreszenz des am 5'-Ende des 18-mers befindlichen FAM-Fluorophors verfolgt werden. Die Auswertung der Kurven erfolgte über eine quadratische Bindungsgleichung. Die bestimmten Affinitäten zwischen 18/36-mer Substrat zu den RT-Mutanten sind in der Tabelle aufgeführt (**C**).

Die für die anderen Mutanten ermittelten Dissoziationskonstanten sind in der Tabelle (siehe Abbildung 4.25 C) aufgeführt. Alle Werte stimmen sowohl mit den in der Lite-

ratur veröffentlichten als auch mit den durch Ruth Krebs durchgeführten Messungen sehr gut überein [34, 81]. Die eingeführten Mutationen hatten somit keinen Effekt auf die Substratbindung und die Aktivität des Enzyms und konnten zur weiteren Charakterisierung eingesetzt werden. Die RNA 7.7 wurde nicht in die folgenden Experimente eingeschlossen, da sie im Vergleich zur Pseudoknoten-RNA und RT1t49 eine schwächere Affinität zur RT zeigt und durch die Aptamere bereits beide Nukleinsäurechemien (RNA und DNA) repräsentiert waren.

	K_d (pM)		IC_{50} (nM)	
	RT1t49	PS	RT1t49	PS
RT^{Wt}	123 ± 45	44 ± 8	8 ± 1,4	3,6 ± 0,7
RT^{M184V}	97 ± 16	34 ± 9	6,3 ± 1,2	6,4 ± 2,2
RT^{L74V}	110 ± 29	42 ± 7	8,8 ± 1,6	1,8 ± 0,4
RT^{AZT}	30 ± 6,8	30 ± 7	7 ± 0,7	1,1 ± 0,3
RT^{AZT/3TC}	31 ± 14,5	28 ± 6	3,7 ± 0,5	1,7 ± 0,2

Tabelle 2: **Übersicht über Bindungs- und Inhibitionskonstanten der Aptamer-RT-Wechselwirkung.**

Die Dissoziations- und Inhibitionskonstanten wurden - wie unter 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben - über Filterbindungsmessungen, Verdrängungstitrationen und Standard-Polymerasetests bestimmt. Die Bindungskonstanten und IC_{50} -Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Für alle Mutanten gilt, dass sowohl die Bindung als auch die Inhibition durch die Nukleinsäuren im gleichen Konzentrationsbereich wie für den Wildtyp bestimmt werden konnten. Im Fall der AZT/3TC-Mutante in Wechselwirkung mit dem Aptamer RT1t49 konnte eine um den Faktor 4 erhöhte Affinität zur Nukleinsäure (RT^{WT}: 123 pM, RT^{AZT}: 30 bzw. 31 pM) und in der Konsequenz eine Inhibition bei niedrigeren RT1t49-Konzentrationen (RT^{WT}: 8 nM, RT^{AZT3TC}: 3,7 nM) verzeichnet werden. Diese Verbesserung war auch beim Pseudoknoten zu beobachten, allerdings in einem geringeren Maße (Faktor 2). Die erhöhte Affinität der AZT/3TC-Mutante ist auf eine allgemein bessere Nukleinsäurebindungsfähigkeit zurückzuführen, die auch schon für das DNA/DNA-

Substrat gezeigt wurde (siehe Abbildung 4.25).

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die NRTI-Resistenz verursachenden Mutationen in der RT-Sequenz keinen negativen Effekt auf die Bindung der Aptamere ausüben. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Inhibitionsfähigkeit der Nukleinsäuren auch *in vivo* vollständig erhalten bleibt.

4.4 Einfluss des Nucleocapsid-Proteins auf den RT-vermittelten Polymerisationsprozess

4.4.1 Ausgangssituation

Das NC-Protein hat vielfältige Funktionen innerhalb der Regulation des HIV Lebenszyklus. Das Protein ist an der Ausbildung des Initiationskomplexes (tRNA, viraler RNA und RT) beteiligt und in Strangtransfer-Reaktionen während der reversen Transkription involviert. Außerdem ist bekannt, dass das Protein in der Lage ist, Nukleinsäuren zu binden und doppelsträngige Bereiche in der Sequenz zu entwinden [113]. Dadurch wird der Polymerisationsprozess an Sekundärstrukturelementen innerhalb der viralen RNA erleichtert [68]. Außerdem stabilisiert es die RNA im viralen Partikel. Aufgrund seiner Beteiligung an der reversen Transkription wurde in der Literatur eine Wechselwirkung zwischen NC und RT diskutiert [38]. Die Interaktion zwischen NC und RT zu unterbinden und damit den Prozess der reversen Transkription zu beeinträchtigen, könnte eine weitere Möglichkeit zur Inhibition der HIV Replikation darstellen. Um den Einfluss des NC-Proteins auf den durch die Reverse Transkriptase katalysierten Nukleotid-Einbau zu studieren, sollten in dieser Arbeit transientenkinetische Messungen durchgeführt werden. Erkenntnisse aus diesen Experimenten könnten das Wissen um den unterstützenden Einfluss des NC-Proteins erweitern und in die Entwicklung einer Inhibitionsstrategie einfließen.

4.4.2 Charakterisierung der Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen

4.4.2.1 Wahl der Substrate

Stabile Sekundärstrukturelemente innerhalb der RNA verzögern *in vitro* eine effiziente Polymerisation. Studien konnten zeigen, dass das virale Nucleocapsid-Protein (NC) dieses sogenannte Pausieren verhindert [68]. Die chaperonartige Aktivität des Proteins ermöglicht eine Destabilisierung dieser Strukturen. Daher wurde für die Experimente in dieser Arbeit zunächst ein Substrat ausgewählt, das ein Sekundärstrukturelement aufweist. Das im Folgenden als Hairpin-Substrat bezeichnete Primer/Template wurde in ähnlicher Form bereits von Suo *et al.* für kinetische Messungen verwendet (siehe Abbildung 4.26, B) [147]. Innerhalb des 48 nt langen Template-Stranges liegt eine Haarnadelstruktur vor. Dem Primer (20-mer) ist es möglich, mit dem Sekundärstruktur-freien Bereich des Templates zu hybridisieren. Eine am 3'-Ende des Primers weiterführende Polymerisationsreaktion benötigt jedoch eine Entwindung der Haarnadelstruktur, da das

nächste Nukleotid im Templatestrang bereits basengepaart vorliegt.

Alle bisherigen kinetischen Analysen des Polymerisationsprozesses wurden zumeist an linearen Substraten durchgeführt. Dazu zählen DNA/DNA, DNA/RNA und RNA/RNA-Substrate verschiedener Länge, deren Sequenzen von der Primerbindungsstelle (PBS) innerhalb des viralen Genoms abgeleitet wurden. Daher wurde zum Vergleich zusätzlich das in Abbildung 4.26 A gezeigte, lineare 18/36-mer DNA/DNA Substrat in die Studien mit einbezogen.

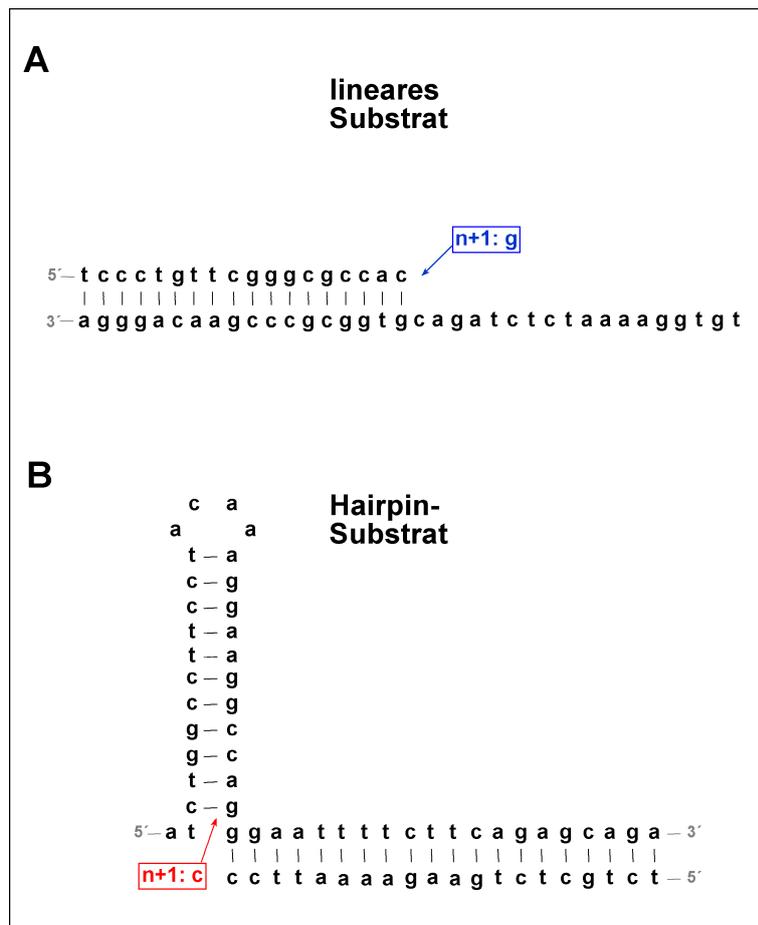


Abbildung 4.26: **Sequenz und Struktur der verwendeten Substrate.** Die Sequenzen der Substrate leiten sich von der Sequenz der Primerbindungsstelle innerhalb des HIV-Genoms ab. Die Sekundärstruktur des Hairpin-Template-Stranges wurde mit dem Programm *mfold* berechnet. Das nächste, korrekt in den Primer einzubauende Nukleotid (n+1) ist farbig markiert.

4.4.2.2 Chaperonaktivität des NC-Proteins

Die in dieser Arbeit verwendeten NC-Proteine wurden freundlicherweise von Y. Mély (Straßburg) und J.L. Darlix (Lyon) zur Verfügung gestellt. Das Protein wurde synthetisch hergestellt und in lyophilisierter Form übersandt. Die Synthesechargen variierten in ihrer Qualität. Daher war es nötig, die Qualität des Proteins hinsichtlich seiner Funktionalität zu überprüfen. Die Chaperonaktivität des NC-Proteins wurde über den von Beltz *et al.* beschriebenen fluoreszenzspektroskopischen Test bestimmt [9].

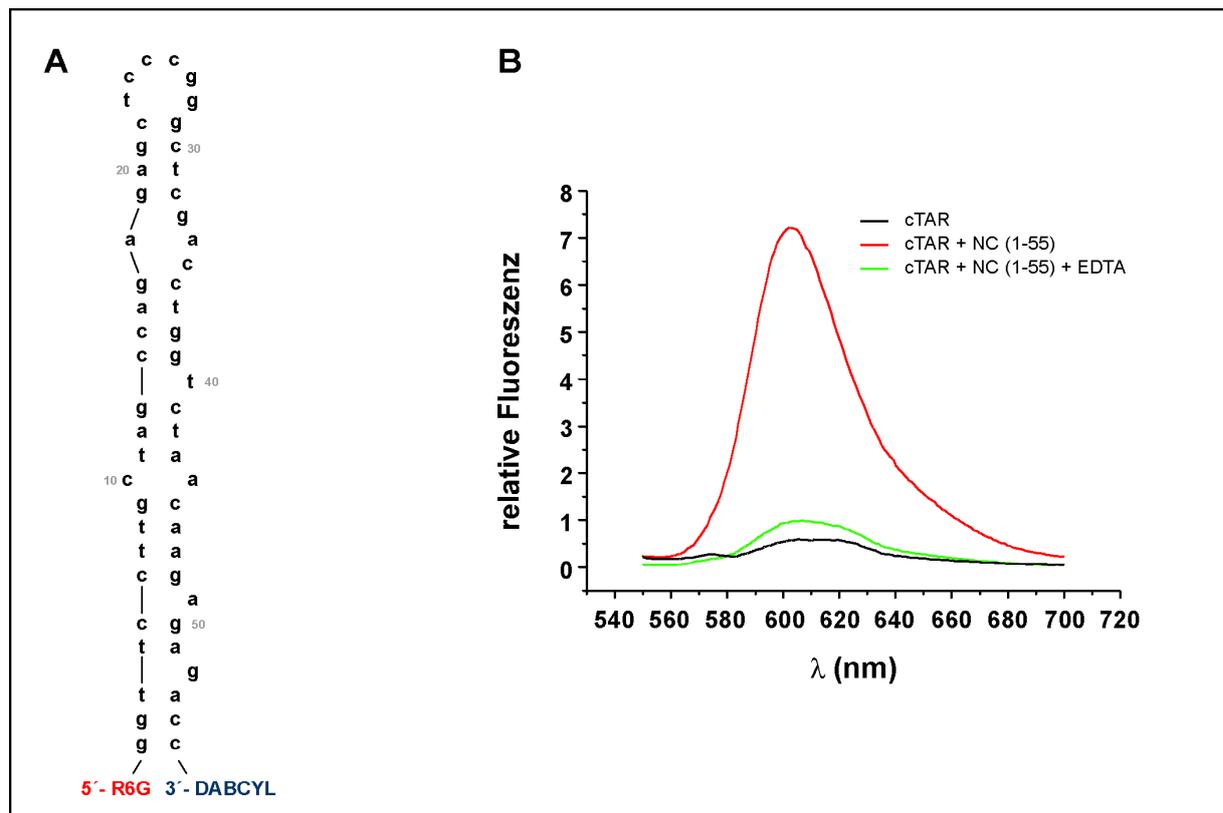


Abbildung 4.27: **Chaperonaktivität des Nucleocapsid-Proteins.** **A:** Sequenz und Sekundärstruktur des verwendeten cTAR Oligonukleotids. Am 5'-Ende der Nukleinsäure befindet sich das Fluorophor 6-Carboxyrhodamin (R6G), am 3'-Ende der Fluoreszenzlöcher DABCYL. Die Sekundärstruktur wurde über das Programm *mfold* berechnet. **A:** Das Emissionsspektrum des am cTAR befindlichen R6G-Fluorophors ($1\ \mu\text{M}$) wurde in Abwesenheit (grün) und Anwesenheit (rot) des Nucleocapsid-Proteins ($1,1\ \mu\text{M}$, Variante 1–55) aufgenommen. In schwarz ist das Emissionsspektrum nach Zugabe von $1\ \text{mM}$ EDTA zum cTAR-NC-Komplex gezeigt.

In Abbildung 4.27 A ist die Sequenz und die Sekundärstruktur des verwendeten Oligonukleotids (cTAR) dargestellt. Die Sequenz entspricht der cDNA-Kopie des TAR RNA Strukturelements aus dem HIV-1 Genom (Mal-Isolat), für das eine spezifische Wechselwirkung mit dem NC-Protein nachgewiesen werden konnte [74]. Am 5'-Ende befindet sich das Fluorophor 6-Carboxyrhodamin (R6G) und am 3'-Ende der Fluoreszenzlöscher Dimethylaminophenylazobenzolsäure (DABCYL), der bei ausgebildeter Haarnadelschleife die von R6G emittierte Fluoreszenz absorbiert. Durch die Chaperonaktivität des NCs wird die Stammstruktur des cTAR-Oligonukleotids aufgewunden und der Fluoreszenzlöscher räumlich vom Fluorophor entfernt, sodass eine erhöhte R6G-Emission verzeichnet werden konnte (siehe Abbildung 4.27 B, rote Kurve). Die Aktivität des NCs wird durch Zugabe von EDTA (1 mM) aufgehoben, da die für die Aktivität des NCs essentiellen Zink-Ionen chelatiert werden (grüne Kurve). In weiterführenden Experimenten wurden diejenigen NC-Präparationen eingesetzt, durch deren Chaperonaktivität im cTAR-Assay eine Fluoreszenzverstärkung um Faktor 4 bis 7,5 erzielt werden konnte.

4.4.2.3 Affinität der RT und des NC-Proteins zu den Substraten

In den für die Einbaustudien verwendeten Reaktionsgemischen (siehe 4.4.3) wurden sowohl RT und Substrat als auch NC eingesetzt. Da beide Proteine Nukleinsäuren binden, sollte zunächst ein besseres Verständnis für die Protein-Nukleinsäure-Interaktionen erlangt werden. Daher wurde die Affinität der Proteinkomponenten zu den Substraten näher charakterisiert. Wie schon in Abschnitt 4.3.3 gezeigt, kann die Dissoziationskonstante des Nukleinsäure-RT-Komplexes über eine Fluoreszenzgleichgewichtstitration bestimmt werden. Hierzu wurde ein Substrat eingesetzt, das am Primer-Molekül mit dem Fluorophor FAM verknüpft und sequenzidentisch zum unmarkierten linearen Substrat war. Wie in Abbildung 4.28 A gezeigt, konnte für das lineare 18/36-mer Substrat ein K_d von $1,2 (\pm 0,27)$ nM bestimmt werden, der in Übereinstimmung mit bisher veröffentlichten Werten steht.

Die Affinität der RT zum Hairpin-Substrat wurde zunächst über ein Filterbindungsexperiment gemessen, das in Abbildung 4.28 B gezeigt ist. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten ergab einen K_d von $57 (\pm 6,8)$ nM. Zusätzlich wurde die Affinität über eine Verdrängungstitration bestimmt (Daten nicht gezeigt). Über dieses Messverfahren konnte ein K_d von 49,6 nM berechnet werden. Beide Methoden lieferten in guter Übereinstimmung einen K_d im mittleren nanomolaren Bereich. Die von Suo *et al.* über einen Filterbindungstest bestimmte Affinität eines Sekundärstruktur-haltigen 25/66-mer zur RT lag bei 24 nM [147]. Die hier ermittelten Messwerte für eine verkürzte Version des von Suo *et al.* verwendeten Substrates lag um den Faktor 2 bis 10 höher.

4.4 Einfluss des Nucleocapsid-Proteins auf den RT-vermittelten Polymerisationsprozess

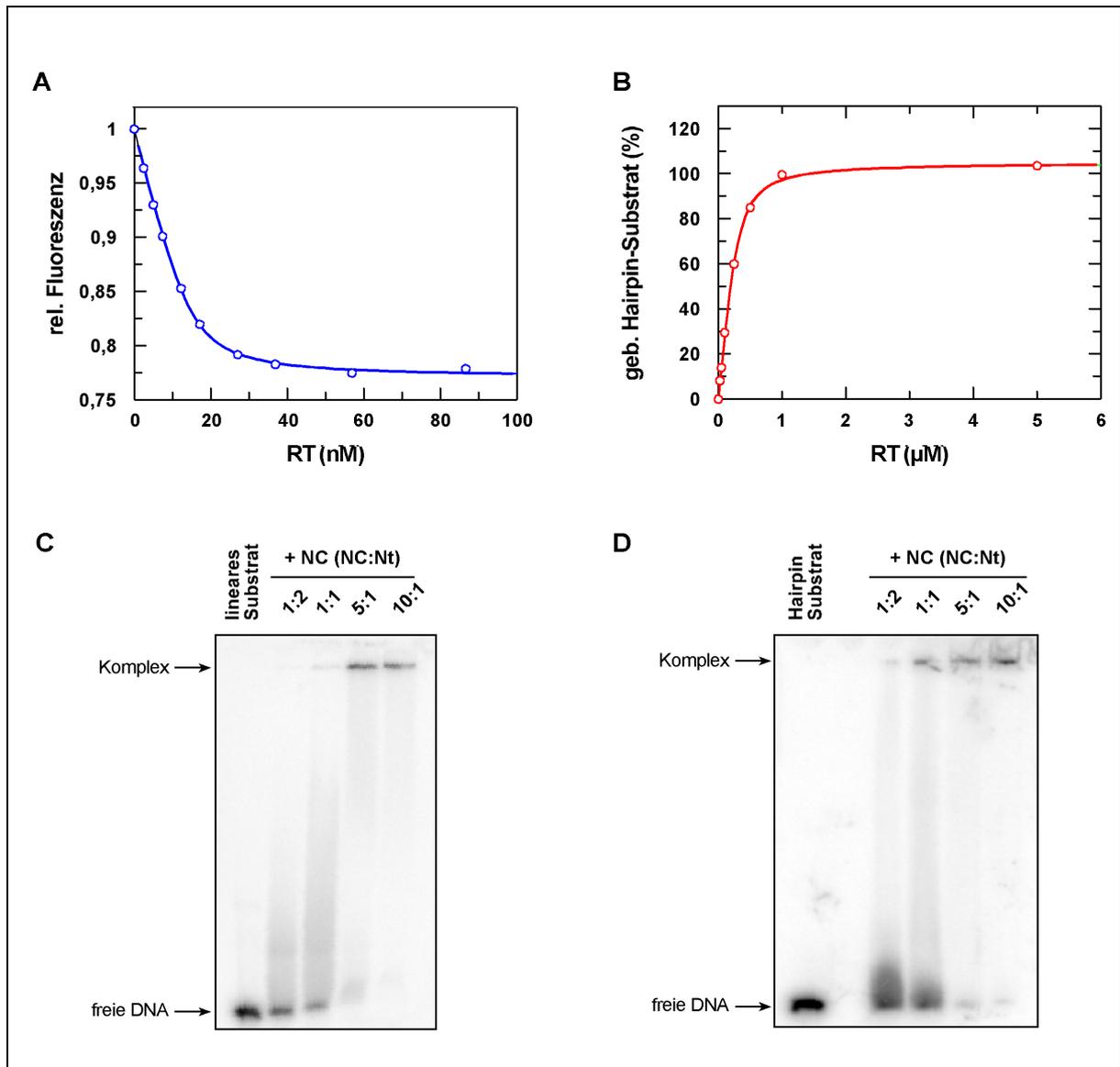


Abbildung 4.28: **Charakterisierung der Substrat-Wechselwirkung mit Reverser Transkriptase und Nucleocapsid-Protein.** Die Affinität des linearen Substrates (25 nM) zur Reversen Transkriptase wurde über eine Gleichgewichtsfluoreszenztitration bestimmt (**A**). Die Auswertung der Daten erfolgte über eine quadratische Bindungsgleichung und ergab einen K_d von $1,2 (\pm 0,27)$ nM. Die Affinität des Hairpin-Substrates zur RT wurde über einen Filterbindungsassay gemessen (**B**). Die Daten wurden mit einer quadratischen Gleichung ausgewertet und ein K_d von $57 (\pm 6,8)$ nM berechnet. **C und D:** Die Interaktion des NC-Proteins mit den Substraten wurde in einem Gelverzögerungsexperiment überprüft. 100 nM des radioaktiv markierten Substrates wurden mit NC bei Raumtemperatur inkubiert und die Verzögerung des Protein-Nukleinsäure-Komplexes in einem nativen Gel analysiert. Angegeben sind die molaren Verhältnisse von NC zu Nukleotidkonzentration im Substrat.

Im Vergleich zum linearen Substrat bleibt zu verzeichnen, dass sich die Anwesenheit einer Haarnadelschleife im Substratmolekül negativ auf die DNA-Bindung zur RT auswirkt.

Das NC ist ein nukleinsäurebindendes Protein. Das Konzentrationsverhältnis zwischen NC-Protein und Substrat wird in der Literatur oftmals im molaren Verhältnis von NC zu Nukleotiden im Substrat ausgedrückt. Diese Konvention wurde auch in dieser Arbeit eingehalten. Wird im Folgenden ein molares Verhältnis von NC zu Nukleotid erwähnt, ist also immer die Nukleotidkonzentration im Substrat und nicht die Konzentration der freien Desoxynukleotide angegeben. Die Affinität des NC-Proteins zu den hier verwendeten Substraten wurde über Gelverzögerungsexperimente verfolgt. Hierzu wurden die Nukleinsäuren (100 nM) mit steigenden Mengen an NC-Protein für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in einem nativen Gel aufgetrennt. In Abbildung 4.28 C und D sind die Autoradiographien der Gele für die Gelverzögerungsexperimente mit linearem und Hairpin-Substrat dargestellt. Mit zunehmenden NC-Konzentrationen wurden ansteigende Mengen eines höhermolekularen Komplexes ausgebildet, der zunächst als ein im Gel verzögerter Schmier zu erkennen war, bei hohen NC-Konzentrationen nicht mehr ins Gel einlief und in den Auftragstaschen verblieb. Für beide Substrate wurde bei einem molaren Verhältnis von NC zu Nukleotid zwischen 5:1 bis 10:1 eine vollständige Verzögerung beobachtet. In diesem Konzentrationsbereich waren alle Substratmoleküle mit NC abgesättigt. Für das TAR-Element (RNA) konnte in ähnlichen Verzögerungsexperimenten bei einem molaren Verhältnis von 2:1 die vollständige Retention der Nukleinsäure gezeigt werden. Bei der TAR/NC-Wechselwirkung handelt es sich jedoch um eine spezifische Interaktion, die neben der ionischen Wechselwirkung zwischen Phosphatrückgrat der Nukleinsäure und positiv geladenem NC-Protein zusätzlich über spezifische Nukleotid-Aminosäure-Interaktionen vermittelt wird. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Bindung der Substrate durch das NC-Protein erst bei höheren molaren Verhältnissen eintritt.

Die Ergebnisse zeigten, dass das verwendete NC in der Lage war, mit den gewählten Substraten in Wechselwirkung zu treten. Es konnte allerdings auch festgestellt werden, dass NC-Chargen, die im Gelverzögerungsexperiment die erwartete Nukleinsäurebindungsaktivität zeigten, im cTAR-Test nur schwach aktiv waren. Daher wurden grundsätzlich beide Tests durchgeführt, um eine differenzierte Aussage über die Qualität des Proteins treffen zu können.

4.4.3 Einzelnukleotideinbaustudien in Anwesenheit des NC-Proteins

4.4.3.1 Auswahl der experimentellen Bedingungen für die Einbaustudien

Der Einfluss des NC-Proteins auf die RT-katalysierte Polymerisationsreaktion sollte zunächst im Sekundenbereich (Handquench-Methode, siehe 3.4.5.2) analysiert werden. Im *in vitro* Polymerisationsansatz wurde zunächst das Hairpin-Substrat eingesetzt, da die Vermutung nahe lag, dass das NC durch seine Chaperonaktivität den Einbau des nächsten Nukleotids durch Entwindung der Sekundärstruktur im Template positiv beeinflussen würde. Da lediglich ein Reaktionszyklus für das eingesetzte Enzym betrachtet werden sollte (*single turnover*), wurde dem Reaktionsgemisch zusätzlich ein Kompetitor im 50fachen Überschuss (nicht markiertes, lineares 18/36-mer Substrat) zugefügt. Nach Einbau eines Nukleotids dissoziiert die RT vom Substrat und muss für den nächsten Einbauschritt erneut an das Substrat binden. Liegen im Reaktionsgemisch weitere Substratmoleküle im Überschuss vor, bindet die RT im diffusionskontrollierten Schritt der Assoziation mit großer Wahrscheinlichkeit an nicht markierte Substratmoleküle. Durch diese Substratfalle wurde verhindert, dass radioaktiv markiertes Substrat erneut an die RT bindet und ein weiterer Polymerisationsschritt ausgeführt werden konnte. 100 nM des 20/48-mers wurden zunächst mit 550 nM RT vorinkubiert und anschließend in einem zweiten Inkubationsschritt mit NC versetzt. Die Polymerisationsreaktion wurde durch Zugabe des nächsteinzubauenden Nukleotids (dCTP) in Anwesenheit des Kompetitors (5 μ M 18/36-mer) gestartet und für definierte Zeiträume bei 25°C inkubiert, bevor die Reaktion mit TFA abgestoppt wurde. Die Analyse des verlängerten Primermoleküles erfolgte über denaturierende Harnstoff-Gelelektrophorese (siehe 3.3.4.2). Für die ersten Experimente wurden verschiedene molare Verhältnisse zwischen Nucleocapsid und Nukleotid ausgetestet. Es wurde ein Konzentrationsbereich gewählt, der in den Gelverzögerungsexperimenten eine signifikante Wechselwirkung zwischen NC und Substrat erkennen ließ. In Abbildung 4.29 A ist die Autoradiographie eines solchen Einbauxperimentes gezeigt. Neben eines Ansatzes ohne NC-Protein (K) wurde NC im Verhältnis 1:2 und 1:1 eingesetzt. In allen drei Fällen war deutlich der Einbau des nächsten Nukleotids in den Primer zu erkennen (n+1 Einbau). In Anwesenheit des NC-Proteins konnte zusätzlich eine verstärkte Bande für den n+2-Einbau beobachtet werden. Die Auswertung der Bandenstärke erfolgte, wie in Teil B der Abbildung gezeigt, in Abhängigkeit von der Zeit. Ab einem NC zu Nukleotid Verhältnis von 1:1 konnte im Vergleich zur Kontrolle eine gesteigerte Verlängerung des Primers verzeichnet werden. Während nach 300 Sekunden in Abwesenheit von NC 20% des Primers verlängert waren, wurden bei einem molaren Verhältnis von NC zu Nukleotid von 2:1 etwa dreimal mehr Primermoleküle verlängert (Erhöhung der Amplitude auf 57,5%).

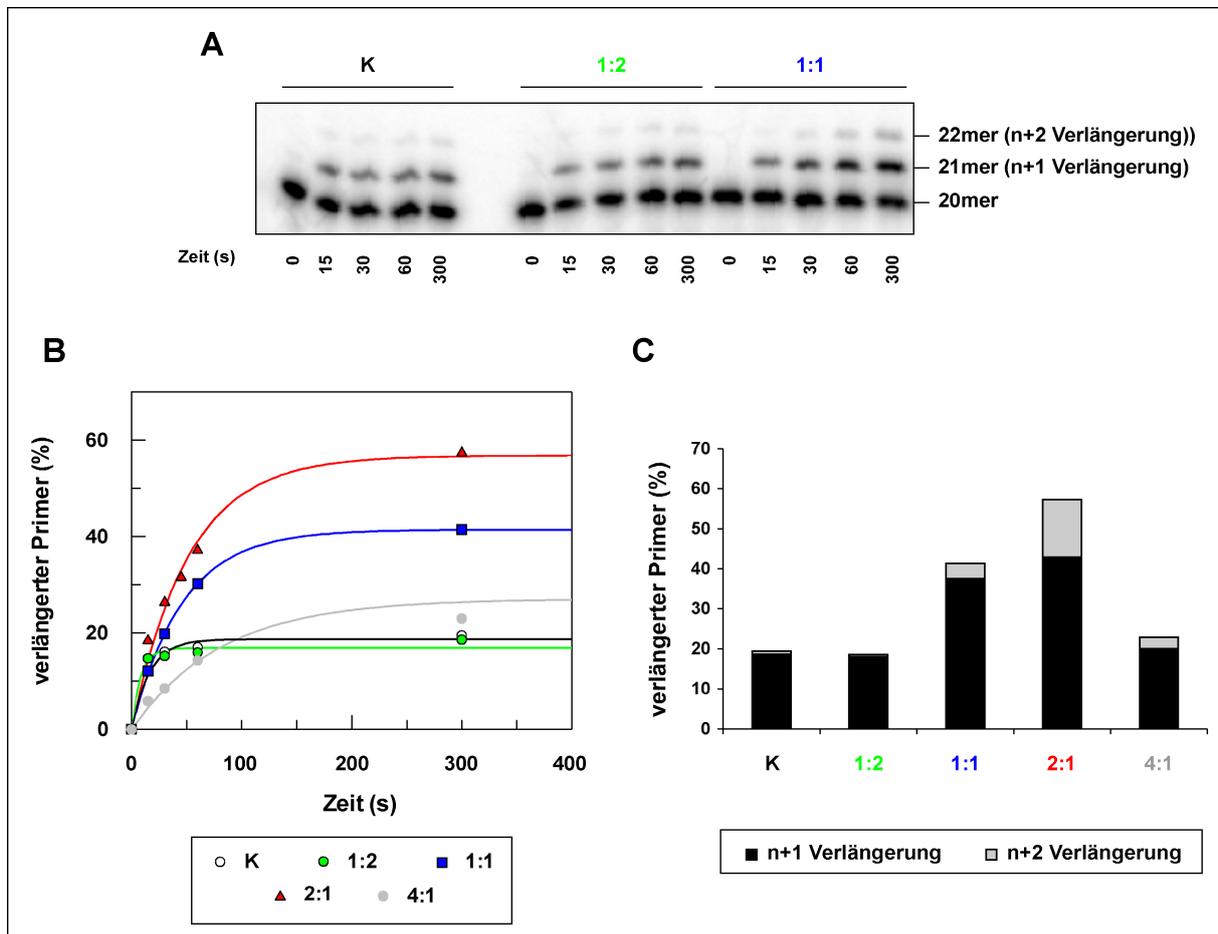


Abbildung 4.29: **Einfluss verschiedener NC-Konzentrationen auf den RT-vermittelten Einzelnukleotid-Einbau.** Ein Komplex aus 100 nM Hairpin-Substrat (20/45-mer), 550 nM HIV-1 RT und unterschiedlichen Konzentrationen an NC (es ist jeweils das molare Verhältnisse zwischen NC und Nukleotidkonzentration des Substrates angegeben) wurde mit 250 μ M dCTP und 5 μ M linearem 18/36-mer DNA/DNA-pt als Kompetitor vermischt. Im Kontrollansatz (K) befand sich kein NC-Protein. Die Reaktion wurde nach definierten Zeiträumen gestoppt und in einem denaturierendem Gel analysiert (**A**). Der Anteil des verlängerten Primers (Summe aus 21-mer und 22-mer) ist gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Daten wurden mit einer einfach-exponentiellen Gleichung ausgewertet (**B**). **C**: Für eine Polymerisationszeit von 300 Sekunden ist für verschiedene molare Verhältnisse zwischen NC und Nukleotid die Verlängerung des Primers nach Anzahl der eingebauten Nukleotide aufgeschlüsselt (n+1-Einbau: 21-mer; n+2-Einbau: 22-mer).

Übersteigt die NC-Menge das Verhältnis von 2:1 ist immer noch eine Steigerung der Amplitude des Einbaus zu verzeichnen gewesen, allerdings ist der Einbau verlangsamt (Kurve in grau, Verhältnis 4:1). In Abbildung 4.29 C ist die Verlängerung des Primers in einer nach n+1 und n+2 Einbau untergliederten Darstellung für die jeweiligen NC zu Nukleotid-Verhältnisse aufgeführt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die gesteigerte Amplitude des Einbaus nicht nur auf den Einbau eines Nukleotids in den Primer zurückzuführen war, sondern im Vergleich zur Kontrolle eine massive Erhöhung des n+2-Einbaus (-NC: 0,88 %, +NC [molares Verhältnis 2:1]: 14,4 %) zu verzeichnen war.

4.4.3.2 Einbaustudien an einem sekundärstrukturhaltigem Substrat

In den Experimenten wurde deutlich, dass das NC-Protein einen stimulierenden Einfluss auf den RT-vermittelten Nukleotideinbau ausübt. Es wurden im Verhältnis zur Kontrolle mehr Primer-Moleküle um ein Nukleotid verlängert (n+1 Einbau). Außerdem war der Anteil der n+2-verlängerten Primer gesteigert. Der Effekt wies ein Optimum für die eingesetzte NC-Menge auf, die bei einem NC zu Nukleotid-Verhältnis von 2:1 lag. Dieses Verhältnis wurde in allen späteren Experimenten beibehalten.

Die Experimente wurden in Anwesenheit eines Kompetitors (nicht markiertes p/t) durchgeführt, der verhindern sollte, dass die RT mehrere Reaktionszyklen an unterschiedlichen Substraten durchlaufen würde. Da das NC-Protein jedoch auch zur Bindung von Nucleinsäuren fähig ist, war nicht klar, ob die erhöhte Amplitude auf Bindung des freien p/t durch das NC zurückzuführen war. Da dementsprechend weniger unmarkiertes Substrat zur Verfügung stände, wäre der Falleneffekt aufgehoben und ein Mehrfachumsatz durch die RT möglich. Daher wurden weitere Experimente durchgeführt, in denen die Pseudoknoten-RNA in verschiedenen Konzentrationen als Kompetitor eingesetzt wurde. Das Pseudoknoten-Aptamer bildet einen langlebigeren Komplex mit der RT aus, da es im Vergleich zum DNA/DNA Primer-Template eine langsamere Dissoziation vom Enzym aufweist [76]. Aus diesem Grund eignet sich die RNA besonders gut für Polymerisationsexperimente mit Falleneffekt und wurde zusammen mit dem nächstfolgenden dNTP beim Start der Reaktion zugesetzt (5 bzw. 25 μM). In Abbildung 4.30 A ist die Kinetik des Polymerisationsprozesses am Hairpin-Substrat unter den neu gewählten Bedingungen gezeigt. Das Phänomen der erhöhten Amplitude in Anwesenheit von NC konnte nach wie vor beobachtet werden. Durch die Erhöhung der Pseudoknoten-Konzentration war eine leichte Reduktion des Effekts zu beobachten. Eine weitere Erhöhung hatte jedoch keinen weiteren Einfluss auf die Höhe der Amplitude (Daten nicht gezeigt). Durch die erhöhte Kompetitor-Konzentration konnte sichergestellt werden, dass der positive Effekt durch den Einfluss des NC-Proteins hervorgerufen wurde und nicht auf Mehrfachumsatz

aufgrund von zu geringen Konkretorkonzentrationen zurückzuführen ist. Die Anwesenheit des NCs erhöhte die Konzentration an verlängertem Primer um den Faktor 2 (Kontrolle/+PS: 14,3%, +NC/+PS: 30,63%). In der detaillierten Analyse der Verlängerungsprodukte (siehe 4.30 B) ist zu erkennen, dass in Anwesenheit von NC auch die n+2-Verlängerung um den Faktor 2,5 angestiegen war (Kontrolle + PS: 0,8%, +NC: 2,1%).

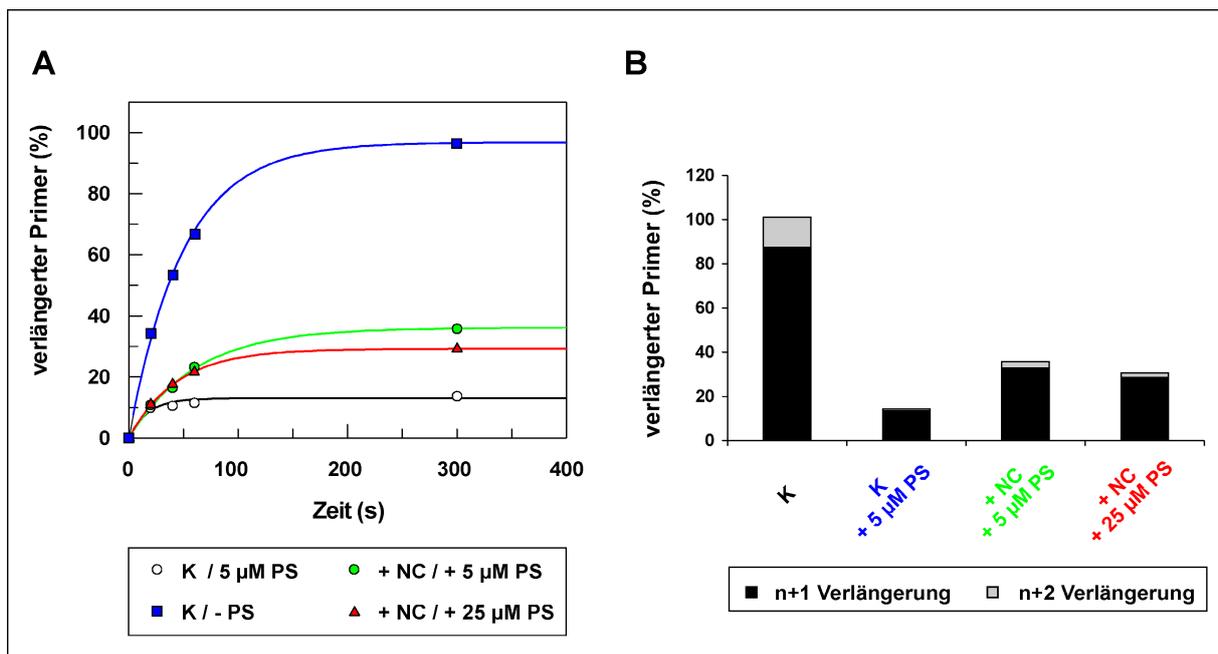


Abbildung 4.30: **Einfluss von NC auf den RT-vermittelten Einzelnukleotid-Einbau in ein Substrat mit Sekundärstruktur.** **A:** Ein Komplex aus 100 nM Hairpin-Substrat (20/48-mer), 550 nM HIV-1 RT und 13,6 μM NC (molares Verhältnis von NC zu Substratnukleotiden von 2:1) wurde mit 250 μM dCTP und 5 μM bzw. 25 μM Pseudoknoten-RNA als Konkretor vermischt. Die Reaktion wurde nach definierten Zeiträumen gestoppt und in einem denaturierenden Gel analysiert. Der Anteil des verlängerten Primers (Summe aus 21-mer und 22-mer) ist gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Daten wurden mit einer einfach-exponentiellen Gleichung ausgewertet. In den Kontrollansätzen (K) befand sich kein NC-Protein. **B:** Für eine Polymerisationszeit von 300 Sekunden ist der prozentuale Anteil des 21-mers (n+1-Einbau) und 22-mers (n+2-Einbau) am Polymerisationsprodukt bei verschiedenen Konkretorkonzentrationen angegeben.

4.4.3.3 Einbaustudien an einem linearen Substrat

Für die Einzelnukleotideinbaustudien wurde zusätzlich auch das lineare Substrat verwendet. Die experimentellen Bedingungen glichen den Versuchsbedingungen für das Hairpin-Substrat. Aufgrund der affineren Bindung zwischen RT und linearem Substrat reichten jedoch 100 nM RT aus, um nahezu sättigende Bedingungen einzustellen. Die Kinetik der Polymerisation wurde verfolgt und ist in Abbildung 4.31 gezeigt.

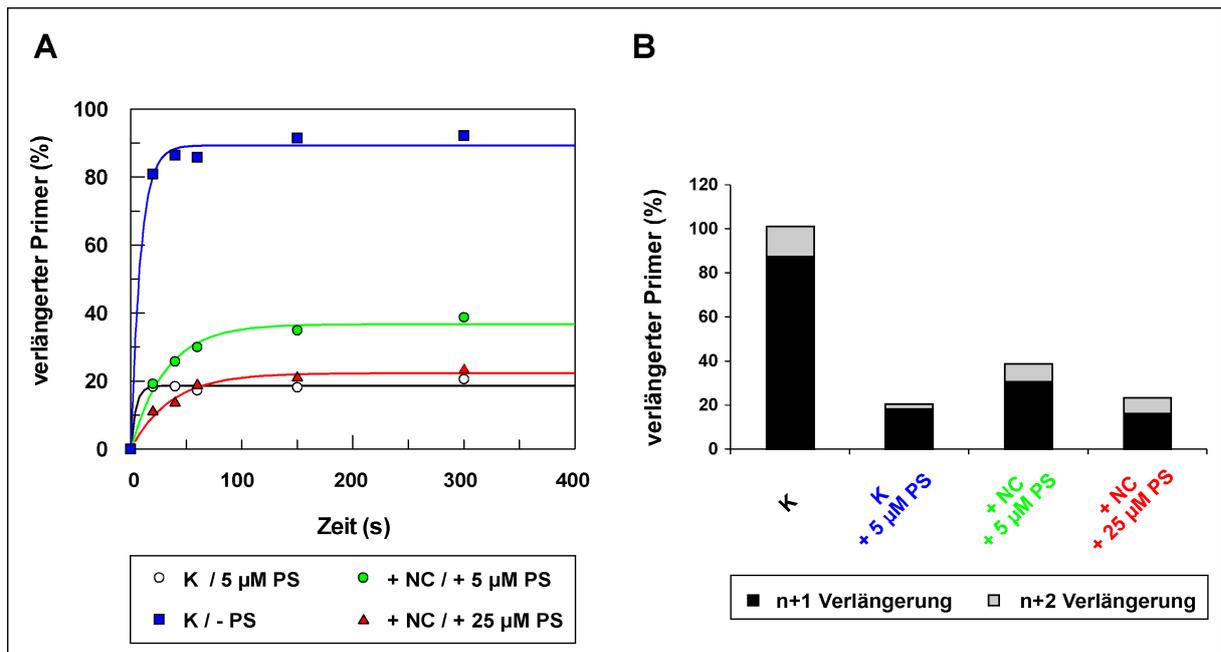


Abbildung 4.31: **Einfluss von NC auf den RT-vermittelten Einzelnukleotid-Einbau in ein lineares Substrat.** **A:** Ein Komplex aus 100 nM linearem Substrat (18/36-mer), 100 nM HIV-1 RT und 10,8 μ M NC (molares Verhältnis von NC zu Substratnucleotiden von 2:1) wurde mit 250 μ M dGTP und 5 μ M bzw. 25 μ M Pseudoknoten-RNA als Kompetitor vermischt. Die Reaktion wurde nach definierten Zeiträumen gestoppt und in einem denaturierenden Gel analysiert. Der Anteil des verlängerten Primers (Summe aus 19-mer und 20-mer) ist gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Daten wurden mit einer einfach-exponentiellen Gleichung ausgewertet. In den Kontrollansätzen (K) befand sich kein NC-Protein. **B:** Für eine Polymerisationszeit von 300 Sekunden ist der prozentuale Anteil des 19-mers (n+1-Einbau) und 20-mers (n+2-Einbau) am Polymerisationsprodukt bei verschiedenen Kompetitorkonzentrationen angegeben.

Der für das Hairpin-Substrat gezeigte Effekt der Amplitudenvergrößerung konnte in diesem Fall nur im geringen Maße beobachtet (+3%) werden. Die Aufschlüsselung der Reaktionsprodukte zeigte, dass die n+1 Verlängerung um 2% verringert war, jedoch die

n+2 Verlängerung um den Faktor 3 erhöht war (Kontrolle + PS: 2,4 %, + NC: 7,1 %). Der erhöhte Prozentsatz der Primerverlängerung war bei einem linearen Template somit auf den um den Faktor 3 gesteigerten Anteil der n+2-Verlängerung zurückzuführen bei gleichzeitig leicht reduzierter n+1-Verlängerung.

4.4.3.4 Studien zum Fehleinbau in ein lineares Substrat

Die Einbaustudien an einem linearen Substrat in Anwesenheit des NC-Proteins zeigten, dass der n+2-Einbau verstärkt war. An dieser Position erfolgt der Einbau des zugegebenen Nukleotids dGTP gegenüber einem Adenosin und entspricht damit einem Falscheinbau. Daher sollte geprüft werden, ob das NC-Protein einen Einfluss auf den Falscheinbau ausübt. Das in Abschnitt 4.4.3.3 beschriebene Experiment wurde für diese Versuche abgewandelt. Zum Start der Reaktion wurde entweder dATP, dCTP oder dTTP (je 2 mM) in Anwesenheit von 25 μ M Pseudoknoten-RNA zugesetzt und somit ein Falscheinbau gegenüber einem Cytosin hervorgerufen. In Abbildung 4.32 A ist nochmals die Sequenz des linearen Substrats aufgeführt und die Position für den nächstmöglichen Richtigeinbau der zugesetzten Nukleotide farbig hervorgehoben. In Teil B der Abbildung ist die Analyse der Polymerisationsprodukte gezeigt. Für die beiden Nukleotide dATP und dCTP war im Vergleich zum Richtigeinbau (dGTP) eine deutlich reduzierte Produktbildung zu beobachten. Die Anwesenheit des NC-Proteins hatte einen leicht negativen Einfluss auf den Falscheinbau der beiden Nukleotide. Die hier beobachteten Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein. Von Cramer *et al.* wurde gezeigt, dass Reaktionen unter Falscheinbaubedingungen zu einer Reduktion der Polymerisationsrate und -amplitude führt [26]. Im Gegensatz dazu stehen die Daten zum Falscheinbau von dTTP. Der Einbau dieses Nukleotids führt zu einem ähnlich hohen Anteil von verlängertem Primer wie im Fall des Richtigeinbaus (dGTP: 20,6 %, dTTP: 18,1 %). Die Anwesenheit des NC-Proteins erhöht in beiden Fällen den Prozentsatz des verlängerten Primers (dGTP: 23,3 %, dTTP: 23,9 %), der vor allem auf eine Erhöhung der n+2 Verlängerung zurückzuführen ist. Für den Einbau des dTTPs konnte zusätzlich eine n+3 und n+4-Verlängerung des Primers beobachtet werden. Der Anteil der n+4 Verlängerung ist durch Anwesenheit von NC um den Faktor 5 erhöht. Der hohe Anteil des um zwei Nukleotide verlängerten Produkts ist im Fall des dTTP-Einbaus vermutlich darauf zurückzuführen, dass dTTP an Position 2 und 4 korrekt gegenüber einem Adenosin eingebaut wird. Da die Einbaurate für ein richtiges Nukleotid deutlich höher liegt als für den Falscheinbau wird der um ein Nukleotid verlängerte Primer in diesem Zeitfenster umgehend um ein weiteres Nukleotid verlängert. In Anwesenheit des NCs wird der weitere Einbau bis zu Position 4 möglich.

4.4 Einfluss des Nucleocapsid-Proteins auf den RT-vermittelten Polymerisationsprozess

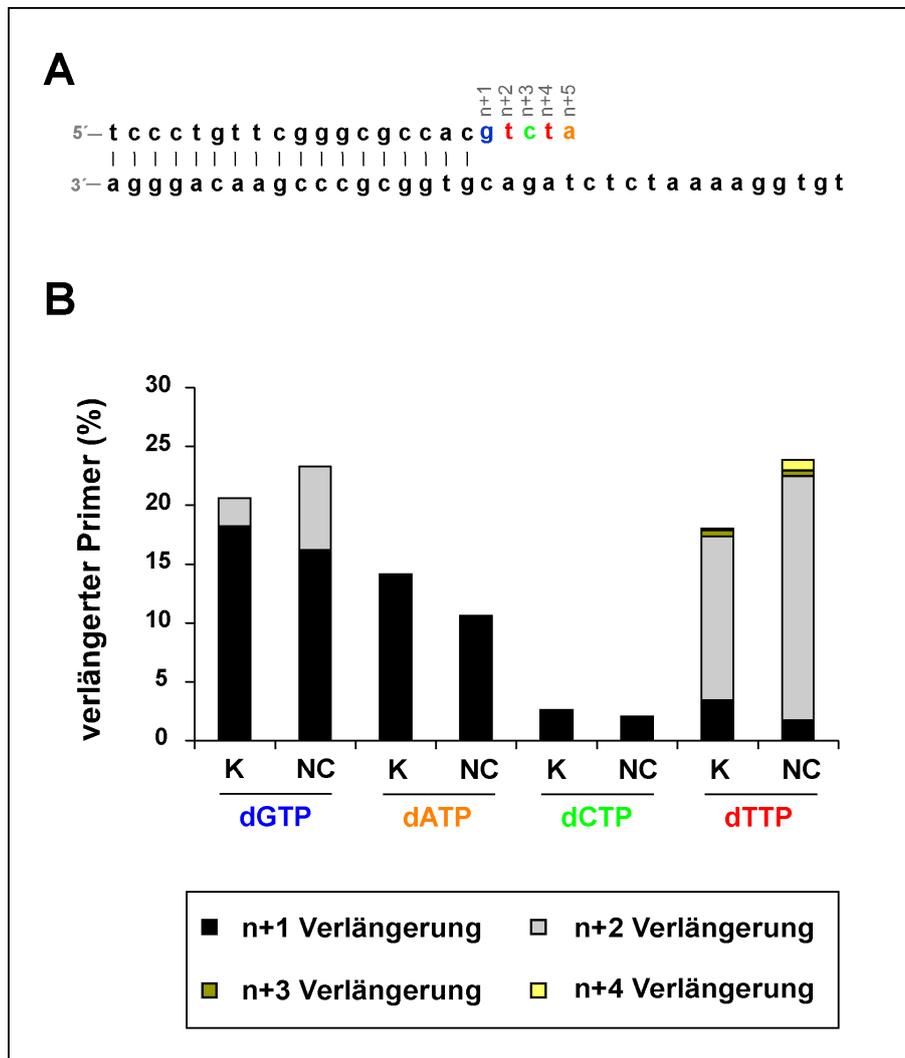


Abbildung 4.32: **Falscheinbau in Anwesenheit des NC-Proteins.** Ein Komplex aus 100 nM linearem Substrat (18/36-mer), 100 nM HIV-1 RT und 10,8 μ M NC (molares Verhältnis von NC zu Substratnukleotiden von 2:1) wurde mit 2 mM des jeweiligen dNTPs und 25 μ M Pseudoknoten-RNA als Kompetitor vermischt. Die Reaktion wurde nach definierten Zeiträumen gestoppt und in einem denaturierenden Gel analysiert. Im Kontrollansatz (K) befand sich kein NC-Protein. Nach einer Polymerisationszeit von 600 Sekunden ist der Anteil des 19-mers (n+1-Einbau) und 20-mers (n+2-Einbau) an der Verlängerung gezeigt. Es wurde der Falscheinbau der Desoxynukleotide dATP, dCTP und dTTP gegenüber einem Cytosin im Vergleich zum Richtigeinbau (dGTP) dargestellt. In **A** ist die Sequenz des Substrats aufgeführt. Die Positionen für einen Richtigeinbau der jeweiligen Nukleotide in das Primermolekül sind mit farbigen Buchstaben hervorgehoben.

In den Einzelnukleotideinbaustudien konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart des Nucleocapsid-Proteins der Anteil des verlängerten Primers im Vergleich zur Kontrollreaktion erhöht war. Da unter *single turnover* Bedingungen gemessen wurde, kam als Grund für diese Amplitudenerhöhung eine längere Verweildauer der Reversen Transkriptase am Substrat in Frage. Durch die erhöhte Lebensdauer des Komplexes würde die Polymerisationsreaktion weiter ablaufen können. Als Ursache für diesen, durch das NC hervorgerufenen, Effekt, waren folgende Gründe vorstellbar:

1. Alle beteiligten Moleküle (NC, RT, Substrat, dNTP, Kompetitor) bilden einen Multikomplex aus. Aufgrund der hohen Konzentrationen ist eine freie Diffusion der Moleküle nach Dissoziation vom Komplex behindert. Ein dissoziiertes RT Molekül kann daher umgehend erneut an das Substratmolekül binden, ohne vom Kompetitor abgefangen werden zu können. Ein nächster Polymerisationsschritt wird möglich, der zur Erhöhung des umgesetzten Substratanteils führt.
2. Die Prozessivität einer Polymerase ist als Verhältnis der Polymerisationsrate zur Dissoziation des Substrats vom Enzym definiert. Ein gesteigerter Einbau könnte demnach
 - auf eine verringerte Dissoziation des Substrats oder
 - auf eine gesteigerte Polymerisationsrate

zurückzuführen sein. Beide Effekte könnten durch eine Wechselwirkung des NCs mit der RT vermittelt werden.

In dieser Arbeit wurden zeitaufgelöste fluoreszenzspektroskopische Messungen etabliert, die Aussagen über die Dissoziationsraten des Substrats und die unter Punkt 1 aufgeführte Möglichkeit der Multikomplexbildung möglich machten. Zusätzlich wurde die Quench-Flow-Methode herangezogen, um die Polymerisationsrate der Reversen Transkriptase in Anwesenheit des NCs zu messen.

4.4.4 Einfluss des NC-Proteins auf die Dissoziation des Substrats von der HIV-1 RT

Um die Dissoziation der RT vom Substrat zu bestimmen, wurde ein fluoreszenzspektroskopischer Ansatz gewählt, der bereits erfolgreich eingesetzt wurde, um Einzelmoleküluntersuchungen an RT-Substrat-Komplexen durchzuführen [128]. Hierbei sind sowohl die Reverse Transkriptase als auch das Primer-Molekül des Substrats mit einem Fluorophor versehen. Liegen RT und Substrat in einem Komplex vor, wird aufgrund der räumlichen

4.4 Einfluss des Nucleocapsid-Proteins auf den RT-vermittelten Polymerisationsprozess

Nähe der Fluorophore eine Übertragung der Fluoreszenzenergie von Donor (Alexa488) zu Akzeptor (Cy5) möglich. Durch Messen des Fluoreszenzsignals des Akzeptors wird eine Aussage zur Fluoreszenzübertragung und damit zur räumlichen Nähe der Moleküle möglich.

Für diese Versuche wurde eine RT eingesetzt, die an Position 287 das einzig zugängliche Cystein trug. Das Fluorophor Alexa488 wurde kovalent mit dem Cystein verknüpft und alle freien Farbstoffmoleküle abgetrennt. Das so präparierte Protein wurde freundlicherweise von Paul Rothwell (MPI Dortmund) zur Verfügung gestellt. In ihren katalytischen Eigenschaften zeigt diese RT-Variante keinerlei Unterschied zum unmodifizierten Pendant [127]. Als Substrat wurde eine lineares 19/36-mer eingesetzt. Am 5'-Ende des Primer-Moleküls befand sich – verknüpft über eine C6-Aminobrücke – das Fluorophor Cy5. In Abbildung 4.33 A ist die räumliche Anordnung der Fluorophore in der RT-Struktur gezeigt. Der anhand der Kristallstruktur abgeschätzte Abstand der Fluorophore zueinander liegt mit 40 Å im Bereich des Förster-Radius, in dem eine optimale Übertragung der Fluoreszenzenergie möglich ist.

Zunächst wurde überprüft, ob eine Fluoreszenzübertragung von Akzeptor- auf Donorfluorophor im RT-Substrat-Komplex stattfindet. Dafür wurden Emissionsspektren im Bereich von 450 bis 750 nm aufgenommen (Anregungswellenlänge: 493 nm). Befand sich lediglich die Reverse Transkriptase (100 nM) im Messpuffer, konnte ein Emissionssignal im Wellenlängenbereich der Alexa488-Emission gemessen werden (siehe Abb. 4.33 B, schwarze Linie). Wurde die RT mit dem fluoreszenzmarkierten Substrat (100 nM) versetzt, konnte zusätzlich ein zweiter Peak ermittelt werden, der im Wellenlängenbereich der Cy5-Emission lag (rote Kurve). Wie es für eine Energieübertragung zu erwarten war, verringerte sich gleichzeitig die Alexa488-Emission. Für das gewählte Fluorophorpaar konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen somit bei Vorhandensein eines RT-Substrat-Komplexes eine Fluoreszenzenergieübertragung vom Donor auf den Akzeptor nachgewiesen werden, das im Weiteren als „FRET-Signal“ bezeichnet wird.

Die Zugabe des Kompetitors sollte in diesem System zu einer Substratverdrängung führen, was am Ausbleiben des FRET-Signals zu erkennen wäre. Der RT-Substrat-Komplex wurde mit 25 µM Pseudoknoten-RNA in Anwesenheit des nächst einzubauenden Nukleotids (dATP) versetzt. Das nach kurzer Zeit aufgenommene Emissionsspektrum weist keinen Cy5-Emissionspeak mehr auf (grüne Linie); der RT-Substrat-Komplex lag nicht mehr vor. Auch hier war ein vermindertes Signal für die Alexa488-Emission zu verzeichnen, das allerdings auf Fluoreszenzquenching-Effekte aufgrund der Pseudoknotenbindung an die RT zurückzuführen war. Kontrollexperimente mit fluoreszenzmarkierter RT und Pseudoknoten-RNA in Abwesenheit des Substrats führten zu einem ebenfalls verminderten Alexa488 Emissionssignal (Daten nicht gezeigt).

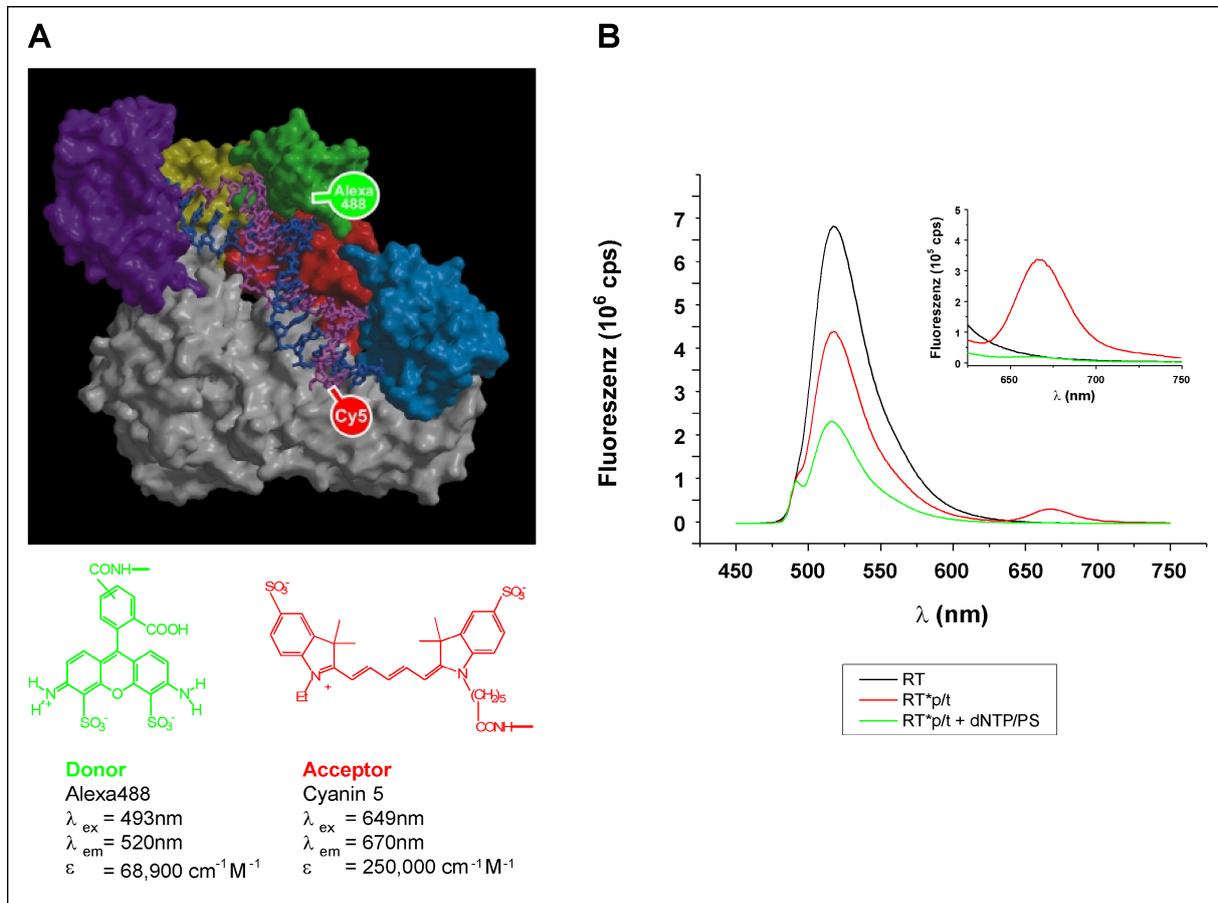


Abbildung 4.33: **FRET-System zur Bestimmung der Dissoziation von p/t Substrat von HIV-1 RT.** **A:** Die Struktur der HIV-1 Reversen Transkriptase. Die p51 Untereinheit ist in grau dargestellt, die p66 Domänen in folgenden Farben: RNaseH in blau, Finger in magenta, Handfläche in gelb, Daumen in grün und Verbindungsdomäne in rot. Das Substrat ist als Stabmodell gezeigt (Primer: magenta, Template: blau). Zusätzlich sind die Struktur und Eigenschaften des Donor- und Akzeptorfluorophors abgebildet. Das Donorfluorophor Alexa488 ist kovalent mit einem Cystein an Position 287 (p66 UE) verknüpft. Das Akzeptormolekül Cy5 ist über einen C6-Aminolinker mit dem 5'-Ende des Primer-Moleküls verbunden. **B:** Das Emissionsspektrum (Exitation: 493 nm) im Bereich von 450 nm bis 750 nm wurde für 100 nM HIV-1 RT p51[6H]/p66^{K287C}[A448] (schwarze Kurve), für einen Komplex aus 100 nM HIV-1 RT p51[6H]/p66^{K287C}[A448] und 100 nM Cy5-p/t (rote Kurve) und in Anwesenheit des nächst einzubauenden Nukleotids und der Pseudoknoten-RNA als Kompetitor (grüne Kurve) aufgenommen. Für die Emission des Akzeptorfluorophors (Wellenlängenbereich um 670 nm) ist eine Ausschnittsvergrößerung gezeigt.

4.4 Einfluss des Nucleocapsid-Proteins auf den RT-vermittelten Polymerisationsprozess

Über diese Methode war es möglich, direkt die Dissoziationsrate des Substrats von der RT zu messen. Da der Pseudoknoten keine aktive Verdrängung des Substrats von der RT hervorrufen kann, ist Abnahme des FRET-Signals nach Zugabe des PS ausschließlich auf die Dissoziation des Substrats von der RT zurückzuführen.

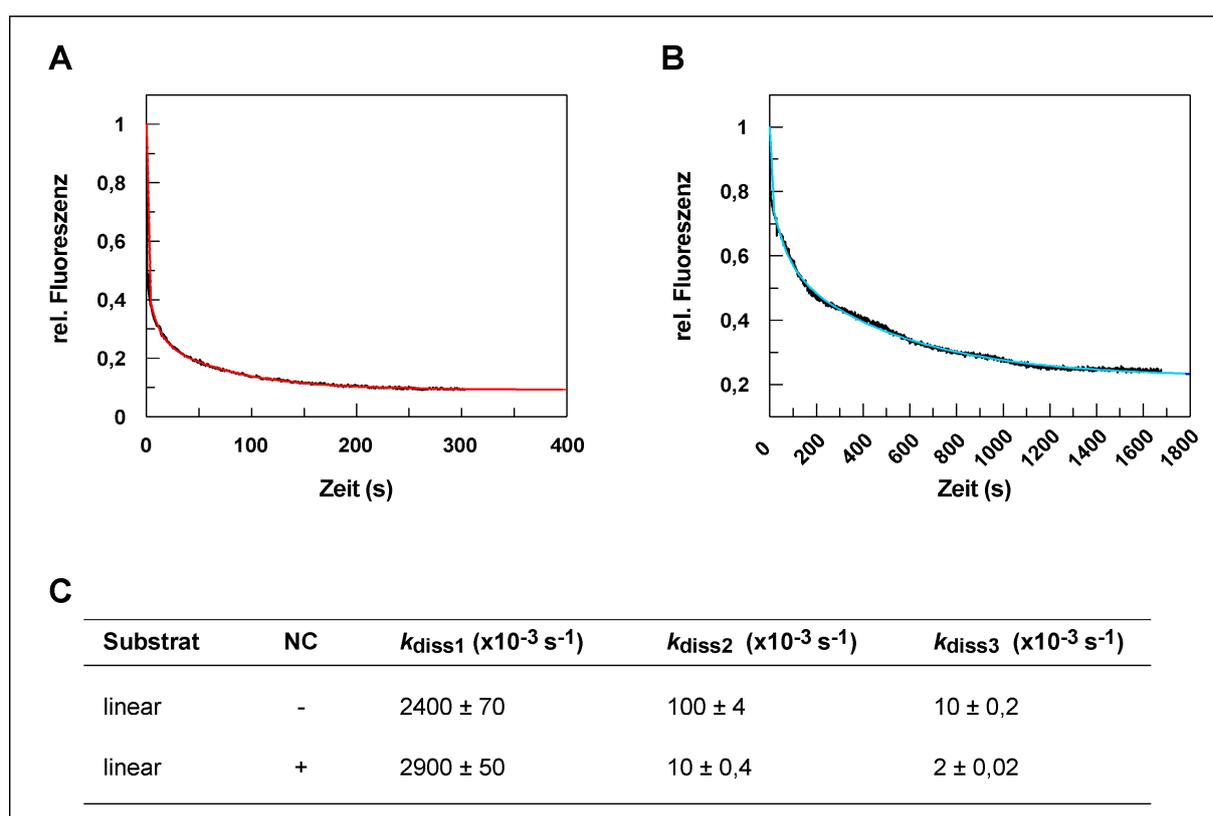


Abbildung 4.34: **Dissoziation von p/t von HIV-1 RT.** 100 nM HIV-1 RT p51[6H]/p66^{K287C}[A448] und 100 nM Cy5-p/t wurden vorinkubiert und schnell mit 250 μM dATP und 25 μM Pseudoknoten-RNA gemischt. Die Zeitabhängigkeit der p/t Dissoziation über das FRET-Signal bei 670 nm verfolgt (**A**). Die Kurve wurde mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet. In **B** ist der Verlauf der Dissoziation in Anwesenheit des NC-Proteins dargestellt. Die Tabelle gibt eine Übersicht der Dissoziationsraten in An- und Abwesenheit des NC-Proteins (**C**).

Um die Dissoziationsrate zu bestimmen, wurde ein vorinkubierter Komplex aus RT und Substrat (je 100 nM) sehr schnell mit dem Kompetitor (25 μM Pseudoknoten-RNA) in der Küvette vermischt und das FRET-Signal über die Zeit verfolgt. Um die Ergebnisse aus den Einbaustudien mit den hier ermittelten Ergebnissen vergleichen zu können,

wurde die Kompetitorlösung zusätzlich mit $250 \mu\text{M}$ dATP, dem nächsten in den Primer einzubauenden Nukleotid, versetzt. In Abbildung 4.34 A ist der zeitliche Verlauf der FRET-Signal-Abnahme gezeigt. Über einen Zeitraum von 300 Sekunden ist eine Abnahme des Signals um 90 % zu verzeichnen gewesen. Innerhalb dieses Zeitraumes hatte sich das Signal stabilisiert und der Dissoziationsprozess war abgeschlossen. Die Daten ließen sich über eine dreifach exponentielle Gleichung auswerten. Die Ratenkonstanten für die drei Phasen beliefen sich auf: $2,4 (\pm 0,07) \text{ s}^{-1}$, $0,11 (\pm 0,004) \text{ s}^{-1}$ und $0,01 (\pm 0,0002) \text{ s}^{-1}$. Die Daten stimmen gut mit bisherigen Messungen zum Dissoziationsprozess überein. In Abhängigkeit von Substrat und verwendetem Fluorophor konnten von Ruth Krebs folgende Raten über Stopped-Flow-Messungen ermittelt werden: $1,5\text{--}3 \text{ s}^{-1}$ für die erste Phase, $0,24\text{--}0,8 \text{ s}^{-1}$ für die zweite Phase und $0,01\text{--}0,09 \text{ s}^{-1}$ für die dritte Phase [81]. Es muss angemerkt werden, dass die erste Phase in den hier durchgeführten Messungen nur schwer zu erfassen war, da während des Mischprozesses bereits ein Signalabfall um ca. 40 % erfolgte. Trotz dieser Verzögerung in der Signalaufzeichnung stimmten die Daten mit den wesentlich genaueren Messungen über die Stopped-Flow-Technik überein. Das hier etablierte System erlaubte somit die zuverlässige Bestimmung der Dissoziationsrate über eine Zeit- und Material-sparenden Methode.

Wurden die Experimente unter Zugabe des NC-Proteins durchgeführt, wurde der RT-Substrat-Komplex mit dem NC-Protein vermischt und abgewartet, bis sich das FRET-Signal stabilisiert hatte. Durch Zugabe von NC sank das Signal um ca. 20 % ab, was entweder auf Quenching-Effekte oder eine Bindung von Substratmolekülen durch das NC-Protein zurückzuführen war. In Anwesenheit des NC-Proteins reduzierte sich das FRET-Signal nach Zugabe des Kompetitors um ca. 70 % (siehe Abbildung 4.34 B). Nach Ausbildung des neuen Gleichgewichts lagen noch 30 % des Substrats im Komplex mit der HIV-1 RT vor. Zusätzlich war eine deutliche Verlangsamung des Dissoziationsprozesses zu beobachten. Folgende Dissoziationsraten wurden berechnet: $k_{\text{diss}1}: 2,9 (\pm 0,5) \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{diss}2}: 0,01 (\pm 0,0004) \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{diss}3}: 0,002 (\pm 0,00002) \text{ s}^{-1}$. Für die erste Phase ist kein Unterschied zum Kontrollexperiment ohne NC zu erkennen, aber auch hier muss darauf hingewiesen werden, dass der Abfall des Signals während des Mischprozesses zu schnell war, um eine gesicherte Aussage zuzulassen. Die Raten der Phasen 2 und 3 sind jedoch um den Faktor 10 geringer. Daraus ergibt sich in Anwesenheit von NC eine Verlangsamung des Dissoziationsprozesses um den Faktor 50–100.

Über diese Methode konnten zusätzlich Informationen zum Mechanismus der NC-vermittelten Amplitudenverstärkung während des Nukleotideinbaus gewonnen werden. Wie unter 4.4.3.4 ausgeführt, kam als Grund für die beobachtete Verstärkung die Ausbildung eines Multikomplexes in Frage, der die freie Dissoziation der Moleküle unterbinden könnte. Vergleichend wurden daher NC-Chargen getestet, die keine Chaperonaktivität

aber vollständige Nukleinsäurebindungsfähigkeit aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Eine Verstärkung der Amplitude war in Anwesenheit der inaktiven NC-Proteine nicht möglich. Im FRET-System wurden nach Inkubation der RT-Substrat-Komplexe mit defektem NC Dissoziationsraten bestimmt, die mit einer Messung ohne NC vergleichbar waren (Daten nicht gezeigt). Obwohl das NC-Protein nach wie vor Nukleinsäuren binden konnte und gleiche Konzentrationen für alle Komponenten vorlagen, war keine Verringerung der Substratdissoziation zu verzeichnen. Diese Experimente ließen den Schluss zu, dass aufgrund der hohen Protein- und Nukleinsäurekonzentrationen keine verminderte Dissoziation hervorgerufen wurde und sich alle Moleküle ungehindert in Lösung bewegen konnten. Die Möglichkeit des Multikomplexes schied damit als Ursache für die beobachteten NC-Effekte aus. Vielmehr wurde deutlich, dass die Chaperonaktivität des NCs mit der Verringerung der Dissoziationsrate korreliert. Unter der Annahme, dass das NC gleichzeitig mit Nukleinsäuren als auch mit der RT interagieren kann, tritt die Interaktion mit der RT scheinbar nur dann auf, wenn das NC in einem aktiven Zustand vorliegt. Diese Interaktion zwischen RT und NC würde die beobachteten Effekte erklären.

4.4.5 Kinetik des Nukleotideinbaus in Anwesenheit von NC

Um die dritte Möglichkeit für die durch das NC vermittelte erhöhte Produktbildung zu untersuchen, wurden transientenkinetische Messungen mithilfe der Quench-Flow-Technik (siehe 3.4.5.1) durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, enzymatische Reaktionen im Millisekundenbereich vor Einstellung eines Gleichgewichts zu analysieren. Bisherige kinetische Messungen zeigten, dass der RT-vermittelte Einbau an linearen Substraten in zwei exponentiellen Phasen mit einer anschließenden linearen Phase erfolgt [81].

Zunächst wurden die Experimente mit linearem Substrat (100 nM) durchgeführt, das mit der RT (100 nM) vorinkubiert wurde. Der Start der Reaktion erfolgte durch sehr schnelles Mischen mit der Nukleotidlösung (250 μ M dGTP). Die Nukleotidlösung wurde dabei in sättigenden Konzentrationen eingesetzt, um eine Beeinflussung der zu ermittelnden Einbaukinetik durch Bindungsprozesse des Nukleotids auszuschließen. In Abbildung 4.35 A ist der Verlauf der Produktbildung über die Zeit gezeigt. Die Daten wurden mit einer doppelt exponentiellen Gleichung mit linearer Steigung ausgewertet. Für die zwei exponentiellen Phasen der Polymerisationsreaktion wurden folgende Polymerisationsraten bestimmt: k_{pol1} 135 (± 44) s^{-1} und k_{pol2} 2,4 ($\pm 0,5$) s^{-1} . Die Rate der linearen Phase betrug 2,6 ($\pm 0,3$) s^{-1} . Die erste schnelle Polymerisationsphase, der sogenannte *burst*, spiegelt die Menge des polymerisationsfähigen RT-Substratkomplexes wieder (produktiver Komplex). Die zweite Phase spiegelt den Anteil des Komplexes wieder, der zunächst

einen Isomerisierungsschritt durchlaufen muss, bevor ein Nukleotideinbau erfolgen kann. Die Enzymmoleküle, die im sogenannten *dead end* Komplex vorliegen, müssen zunächst vom Substrat dissoziieren und erneut binden, um einen produktiven Komplex zu bilden. Dieser Anteil wird durch den linearen Anteil repräsentiert.

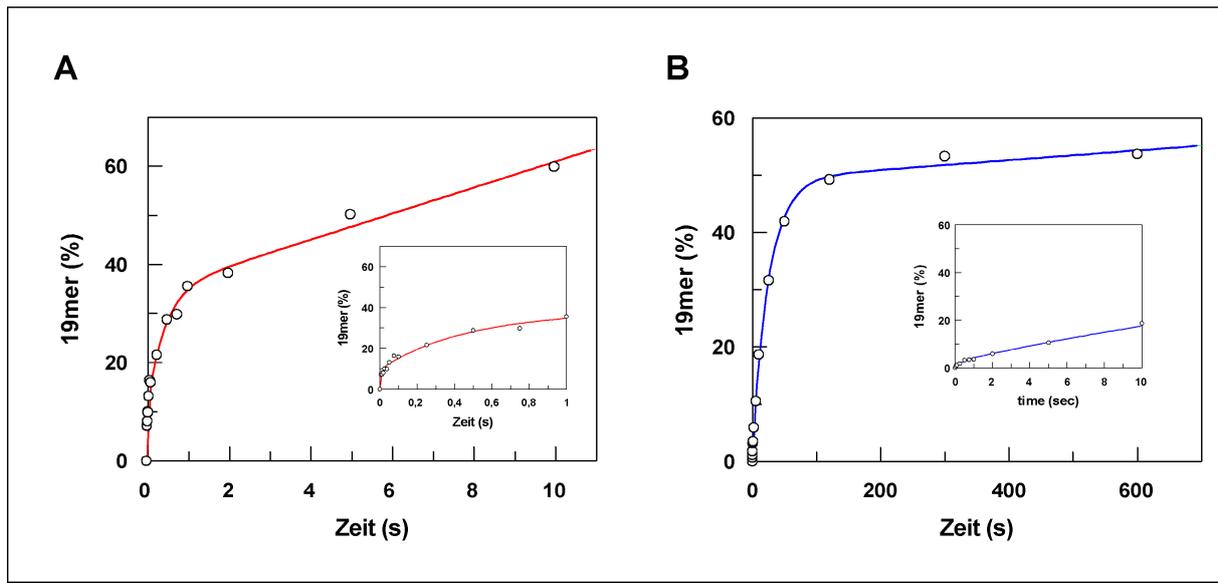


Abbildung 4.35: **Pre-Steady-State Einbaukinetik von dGTP in ein lineares Substrat.** **A:** 100 nM HIV-1 RT wurde mit 100 nM linearem Substrats vorinkubiert, anschließend mit 250 μ M dGTP schnell gemischt und die Reaktion zu den gewünschten Zeitpunkten mit TFA gestoppt. Eine kompetitierende Nukleinsäure wurde nicht eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer zweifach exponentiellen Gleichung. Für die exponentiellen Phasen wurden folgende Polymerisationsraten berechnet: k_{pol1} : $135 (\pm 44) \text{ s}^{-1}$ und k_{pol2} : $2,4 (\pm 0,5) \text{ s}^{-1}$. Im Ausschnitt ist die Anfangsphase der Reaktion gezeigt. **B:** Unter gleichen Reaktionsbedingungen wurde die Einbaukinetik in Anwesenheit von NC (molares Verhältnis NC zu Substratnukleotidkonzentration = 2:1) verfolgt. Für die exponentiellen Phasen wurden folgende Polymerisationsraten berechnet: k_{pol1} : $2,9 (\pm 1,7) \text{ s}^{-1}$, k_{pol2} : $0,04 (\pm 0,002) \text{ s}^{-1}$.

In Anwesenheit des NCs (NC zu Nt-Verhältnis 2:1) waren alle drei Phasen verlangsamt (k_{pol1} : $2,9 (\pm 1,7) \text{ s}^{-1}$, k_{pol2} : $0,04 (\pm 0,002) \text{ s}^{-1}$, die Rate des linearen Anteils betrug $0,009 (\pm 0,002) \text{ s}^{-1}$). Die Polymerisation an einem linearen Substrat läuft in Anwesenheit des NCs vor Einstellung eines Gleichgewichts damit verlangsamt ab.

Vergleichend wurde die Einbaukinetik der Reversen Transkriptase am Hairpin-Substrat gemessen. Um sättigende Bedingungen zu gewährleisten, mussten aufgrund der niedrige-

4.4 Einfluss des Nucleocapsid-Proteins auf den RT-vermittelten Polymerisationsprozess

ren Affinität des Substrats zur RT höhere RT-Konzentrationen ($2\ \mu\text{M}$) gewählt werden. Auch hier ließen sich die Daten mit einer zweifach exponentiellen Gleichung auswerten (Abbildung 4.36A). Der lineare Anteil entfiel, da die Anwesenheit des Kompetitors eine wiederholte Bindung der RT an ein radioaktiv markiertes Substrat verhinderte.

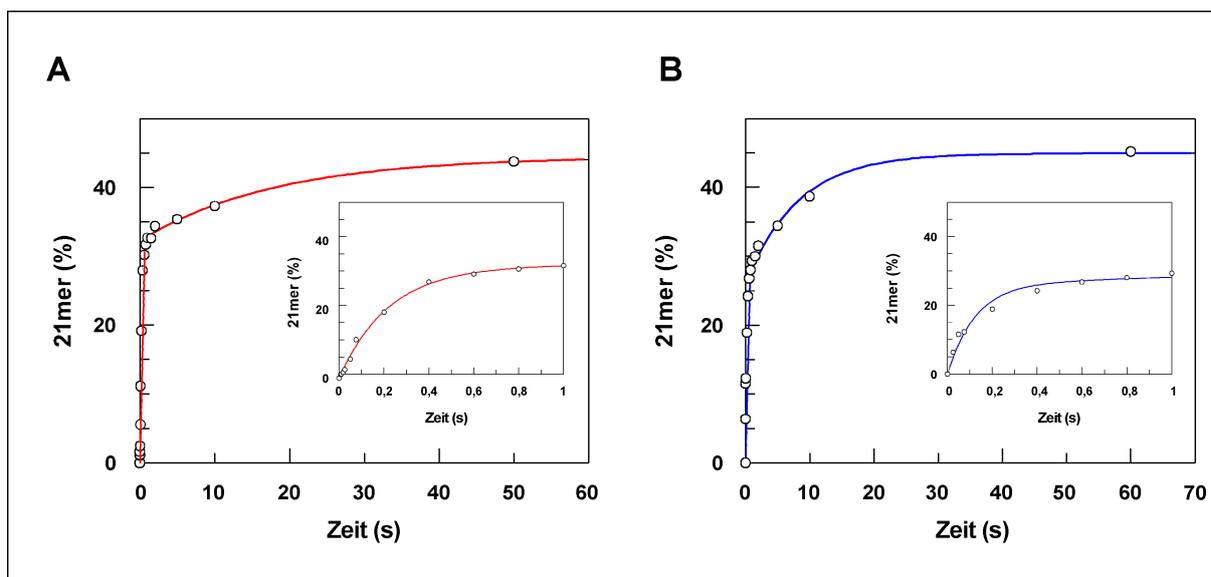


Abbildung 4.36: **Pre-Steady-State Einbaukinetik von dCTP in das Hairpin-Substrat.**

A: $2\ \mu\text{M}$ HIV-1 RT wurde mit $100\ \text{nM}$ Hairpin-Substrat vorinkubiert, anschließend mit $250\ \mu\text{M}$ dCTP in Anwesenheit von $5\ \mu\text{M}$ 18/36-mer als Kompetitor schnell gemischt und die Reaktion zu den gewünschten Zeitpunkten mit TFA gestoppt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer zweifach exponentiellen Gleichung. Für die exponentiellen Phasen wurden folgende Polymerisationsraten berechnet: $k_{\text{pol}1}$: $4,9 (\pm 0,25)\ \text{s}^{-1}$, $k_{\text{pol}2}$: $0,06 (\pm 0,02)\ \text{s}^{-1}$. Im Ausschnitt ist die Anfangsphase der Reaktion gezeigt. **B:** Unter gleichen Reaktionsbedingungen wurde die Einbaukinetik in Anwesenheit von NC (molares Verhältnis NC zu Substratnukleotidkonzentration = 2:1) verfolgt. Für die exponentiellen Phasen wurden folgende Polymerisationsraten berechnet: $k_{\text{pol}1}$: $8,1 (\pm 1,0)\ \text{s}^{-1}$ und $k_{\text{pol}2}$: $0,12 (\pm 0,03)\ \text{s}^{-1}$

Die RT musste zunächst die Stammstruktur des Substrats entwinden bevor der Nucleotid einbau stattfinden konnte. Die Polymerisationsraten waren daher erwartungsgemäß im Vergleich zum linearen Substrat reduziert ($k_{\text{pol}1}$: $4,9 (\pm 0,25)\ \text{s}^{-1}$, $k_{\text{pol}2}$: $0,06 (\pm 0,02)\ \text{s}^{-1}$). Im Gegensatz zum linearen Template konnten für die Reaktion in Anwesenheit des NCs jedoch keine verminderten Raten beobachtet werden. Die Raten der exponentiellen Phasen sind mit $8,1 (\pm 1,0)\ \text{s}^{-1}$ und $0,12 (\pm 0,03)\ \text{s}^{-1}$ um ca. Faktor 2 größer als in der Kontrollreaktion. Als mögliche Erklärung kann die Chaperonfunktion des NCs herangezogen

werden. Die Aufschmelzung der Haarnadelschleife im Template-Strang wird durch das NC beschleunigt und damit der umgehende Einbau des Nukleotids möglich. Wie in Tabelle 3 aufgeführt, war für das lineare Template keine erhöhte Polymerisationsrate zu messen. Die ermittelten Werte wiesen auf eine dramatische Verlangsamung des Polymerisationsprozesses in Anwesenheit des NCs hin. Für das Hairpin-Substrat war eine Verlangsamung nicht zu beobachten. Die Zugabe des NC-Proteins führte zu einer um den Faktor 2 erhöhten Polymerisationsrate.

Substrat	NC	k_{pol1} (s ⁻¹)	Amplitude 1 (%)	k_{pol2} (s ⁻¹)	Amplitude 2 (%)
linear	-	135 ± 44	9,1 ± 1,2	2,4 ± 0,5	24,7 ± 1,9
linear	+	2,9 ± 1,7	7,6 ± 3	0,04 ± 0,002	45,0 ± 2,9
Hairpin	-	4,9 ± 0,25	32,3 ± 0,6	0,06 ± 0,02	12,2 ± 1,2
Hairpin	+	8,1 ± 1,0	26,0 ± 1,1	0,12 ± 0,03	18,9 ± 1,8

Tabelle 3: **Über Quench-Flow Messungen bestimmte Polymerisationsraten der HIV-1 RT an unterschiedlichen Substraten.**

Die Frage, ob der beobachtete Effekt der Amplitudenverstärkung auf die gesteigerte Polymerisationsrate zurückzuführen ist, kann somit nicht für alle Substrate gleichermaßen beantwortet werden. Im Fall des linearen Substrats ist die Einbaurate nicht Ursache der Amplitudenverstärkung. Für das Hairpin-Substrat kommt eine gesteigerte Einbaurate als Grund für den höheren Substratumsatz in Frage. Neben den Polymerisationsraten sind in Tabelle 3 auch die Amplituden der jeweiligen Polymerisationsphasen aufgeführt. Für das lineare Template stellte sich heraus, dass in Anwesenheit des NCs der Anteil der zweiten Amplitude um Faktor 2 erhöht war. Für das Hairpin-Substrat war ebenfalls eine Steigerung um den Faktor 1,5 zu verzeichnen.

4.4.6 Einfluss des NCs auf die Substratdissoziation von der RT in Anwesenheit von RT-spezifischen Antikörpern

Der in den Einbaustudien und Dissoziationsexperimenten beobachtete Einfluss des NCs deutete auf eine Wechselwirkung zwischen RT und NC hin, die bereits von Druillenc *et al.* diskutiert wurde [38]. Diese Interaktion beeinflusst unter anderem die Polymerisation an Sekundärstrukturelementen und den Strang-Transfer positiv. Daher ist die

Wechselwirkung zwischen RT und NC zum einen essentiell für den Replikationszyklus zum anderen ein interessantes Ziel für die Inhibitorentwicklung. Das in dieser Arbeit etablierte System zur Bestimmung der Dissoziationsrate eignet sich, um den Einfluss von Molekülen auf die Interaktion zwischen RT und NC zu ermitteln. Anhand der Dissoziationsrate kann bestimmt werden, ob das NC weiterhin einen Einfluss auf die Dissoziation des Substrats ausüben kann.

Ein Blockade der NC-RT-Interaktion ist bisher nicht möglich gewesen, da nicht bekannt ist, welche Proteindomänen in die Wechselwirkungen der Proteine involviert sind. Um die Kontaktstellen zwischen den Proteinen zu identifizieren, können Antikörper eingesetzt werden, die einen Teil der Aminosäuresequenz für den Interaktionspartner maskieren. Die Bindung eines Antikörpers an sein Epitop könnte möglicherweise die Interaktion der RT mit dem NC-Protein beeinflussen, was sich wiederum im etablierten Assay in einer veränderten Dissoziationsrate für das Substrat äußern würde. Für diese Arbeiten standen RT-gerichtete monoklonale Antikörper zur Verfügung, die von Tobias Restle im Rahmen seiner Dissertation hergestellt wurden [116]. Die Bindungsdomänen der Antikörper sind innerhalb der AS 200-230, 300-428 und 528-560 lokalisiert und decken damit einen Großteil der Aminosäuresequenz der HIV-1 RT ab. Testweise wurden dem RT-Substrat-Komplex vor Zugabe des NCs jeweils ein Antikörper zupipettiert. In Anwesenheit der Antikörper konnte jedoch keine veränderte Dissoziationsrate bestimmt werden, sodass mithilfe dieser Methode keine Blockade der RT-NC-Wechselwirkung hervorgerufen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

Seit der Entdeckung des HI-Virus als Ursache der erworbenen Immunschwäche des Menschen (AIDS) im Jahr 1983 wurde das Virus in den letzten Jahrzehnten detailliert studiert und biochemisch charakterisiert. Je umfassender das Verständnis der enzymatischen Abläufe innerhalb der Virusreifung und -vermehrung wurde, desto effektivere Inhibitoren konnten entwickelt werden. Bisher sind in erster Linie die viralen Proteine Reverse Transkriptase (RT) und Protease Ziel der Wirkstoffe, da die enzymatische Aktivität beider Enzyme essentiell für den Lebenszyklus des Virus ist. Auf Grund der hohen Fehlerrate der viralen Polymerase verbunden mit der hohen Replikationsrate traten und treten jedoch immer wieder resistente Formen des Virus auf, die kaum bzw. keinerlei Reaktion auf die Inhibitoren zeigen. Demnach bleiben diese und andere Proteine weiterhin im Fokus der Inhibitorentwicklung.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Wege in der Inhibitorentwicklung zu gehen. Studien zur Dimerisierung der Reversen Transkriptase (siehe 5.1) und die Untersuchungen zum Einfluss des Nucleocapsid-Proteins auf die RT-katalysierte Polymerisationsreaktion (siehe 5.5) sollten Einblicke in die Funktionsweise der RT geben und Möglichkeiten zur Inhibition aufdecken.

Aufbauend auf diesen Arbeiten wurden potenzielle inhibitorische Moleküle auf ihre Wirksamkeit getestet. Dabei sollte ein breites Spektrum an Molekülklassen abgedeckt werden, sodass sowohl Peptide (siehe 5.3) als auch Nukleinsäuren (siehe 5.4) und niedermolekulare Substanzen (siehe 5.2) in die Tests einbezogen wurden.

5.1 Aminosäuren in der p51 UE stabilisieren das RT-Heterodimer

Die Reverse Transkriptase ist ein heterodimeres Protein, das aus den beiden Untereinheiten p66 und p51 besteht. Dabei geht die p51 Untereinheit durch eine proteolytische Spaltung am C-Terminus aus dem p66 Protein hervor. Die größere p66 Untereinheit beherbergt alle enzymatischen Funktionen (RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität, RNaseH-Aktivität). Im Gegensatz dazu ist die p51 Untereinheit katalytisch inaktiv und dient als Stabilisator der großen Untereinheit.

Basierend auf Informationen aus einer Kristallstrukturanalyse (Kooperation mit Eliane Schweizer, ETH Zürich) wurde eine Mutationsstudie durchgeführt, um Aminosäuren in der p51 Untereinheit zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Interaktion der Untereinheiten haben. Dadurch sollte ein erweitertes Verständnis des Dimerisierungsprozesses erlangt werden. Die Aminosäuren Lys331, Asn363 und Asp364 waren aufgrund ihrer intermolekularen Wechselwirkungen von Interesse: Lysin 331 bildet mit der Asparaginsäure 364 ein Salzbrücke aus; Asparagin 363 geht eine π - π Wechselwirkung mit dem Tryptophan 401 der p66 Untereinheit ein. Dieses Tryptophan interagiert mit dem Tryptophan 401 der p51-Untereinheit über eine *edge-to-face*-Wechselwirkung. Alle Aminosäuren liegen im Interaktionsbereich des sogenannten Tryptophan-Clusters [148]. Die dort gehäuft auftretenden Tryptophane tragen entscheidend zur Dimerstabilität bei. Die in dieser Arbeit durchgeführten Assoziationsstudien der mutierten p51 Untereinheiten mit wildtypischen p66 zeigten, dass eine Mutation des Lysins 331 zu Alanin die Dimerisierung um ca. 70 % reduziert. Für die N363A Mutante konnte ebenfalls eine Reduktion gemessen werden, die mit ca. 40 % aber deutlich schwächer ausfällt. Eine Mutation an Position 364 rief keine verminderte Assoziation der Untereinheiten hervor. Die Ergebnisse ergänzen Two-Hybrid-Studien von Tachedjian *et al.* [148], in denen nachgewiesen wurde, dass in der p66 Untereinheit vor allem die Tryptophane 401 und 414 und in der p51 Untereinheit das Lysin 331 maßgeblich zur Dimerstabilität beitragen. Die Autoren schlagen für Lysin 331 allerdings eine Interaktion zu den Carbonylgruppen der Aminosäuren W402, Y405 und Q407 der p66 Untereinheit vor, die über Wasserstoffbrücken vermittelt wird. Wäre die hier vermutete Salzbrücke zwischen K331 und D364 die maßgebliche Interaktion, würde man für eine Mutation von D364A ebenfalls eine reduzierte Dimerbildung erwarten. Dies konnte in den hier durchgeführten Experimenten jedoch nicht bestätigt werden, sodass die Interaktion mit dem Rückgrat der erwähnten Aminosäuren wahrscheinlicher scheint.

Die verminderte Dimerbildung der N363A Mutante wurde hier erstmals gezeigt. Wie erwähnt, wurde eine π - π Wechselwirkung mit dem Tryptophan 410 (p66) vermutet. Die Beeinflussung des Tryptophans 410 hat auch Auswirkungen auf dessen direkten Interaktionspartner, das Tryptophan 401 (p51). Für eine Mutation an dieser Position (Two-Hybrid-System) wurde eine Reduktion der Interaktion der Untereinheiten um 30 % gezeigt [148]. Da auch in den hier durchgeführten Assoziationsstudien eine Reduktion um 40 % gezeigt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass der Einfluss von N363 tatsächlich über W410 bzw. 401 vermittelt wird.

Analysen der Protein-Protein-Wechselwirkungen zeigten, dass einzelne Aminosäuren gehäuft in den Interaktionsbereichen wiederzufinden sind [14]. Die als Hot-Spot-Aminosäuren bezeichneten hydrophoben Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Arginin treten

wiederholt in Dimerisierungsgrenzflächen auf. Dieses Prinzip scheint sich in den untersuchten Protein-Protein-Interaktionen der HIV-1 RT wiederzufinden. Auch hier tragen vor allem die hydrophoben Tryptophane zur Wechselwirkung bei. Weniger oft, aber dennoch überdurchschnittlich treten Proline, Leucine, Lysine und Asparaginsäuren auf. Der Beitrag dieser Aminosäuregruppe zur Interaktion konnte im Fall der HIV-1 RT in dieser Arbeit am Beispiel des Lysins 331 bestätigt werden. Die Hot-Spot-Aminosäuren sind von Aminosäuren umgeben, deren Funktion vermutlich in der Abschirmung gegen Lösungsmittelmoleküle besteht.

Wie von Restle *et al.* gezeigt, ist die RT ausschließlich als Dimer aktiv. Eine Reduktion des Dimergehalts sollte daher auch Auswirkungen auf die Polymeraseaktivität des Enzyms haben. Diese Korrelation zwischen Dimergehalt und Aktivität konnte für die Reassoziationsansätze mit mutierter p51 UE im Polymerasetest nachgewiesen werden. Lag die Mutation K331A in der p51 UE vor, sank die Polymeraseaktivität im Vergleich zum Wildtyp auf 49%. Die Mutation an Position 363 in der p51 UE wies eine Polymeraseaktivität von 78% auf. Dass die Stabilität des Heterodimers eine Auswirkung auf die Polymeraseaktivität hat, konnte auch in *ex vivo* Experimenten gezeigt werden. Die Mutation des Tryptophans 401 in der p66 UE führt in *in vitro* Studien zu einer stark verminderten Ausbildung des Heterodimers. Wurde die RT-Mutante in Zellkultursystemen getestet war die RT-Aktivität in infizierten Zellen und viralen Partikeln drastisch reduziert [157]. Die gebildeten viralen Partikel waren nicht mehr infektiös.

Die Dimerstabilität konnte, wie in dieser Arbeit gezeigt, durch die Mutation der Aminosäuren K331 und N363 in der p51 UE verringert werden. Moleküle, die diese Aminosäuren blockieren und damit die Dimerausbildung unterbinden, könnten somit die Assoziation der Untereinheiten beeinträchtigen und zur verminderten Replikationsfähigkeit des HI-Virus führen. In Abschnitt 5.2 ist gezeigt, wie die hier erläuterten Ergebnisse zur Dimerisierung in die Inhibitorentwicklung einfließen.

5.2 Niedermolekulare Moleküle als Dimerisierungsinhibitoren

1990 wurde von Restle *et al.* gezeigt, dass die Reverse Transkriptase ausschließlich als Dimer enzymatisch aktiv ist [117]. Seitdem wird eine Beeinträchtigung der p51-p66-Interaktion als attraktive Inhibitionsmöglichkeit diskutiert [29, 34, 117, 139]. Die Verminderung der Assoziation der RT Untereinheiten wurde als alternatives therapeutisches Ziel vorgeschlagen, weil Inhibitoren der Assoziation wahrscheinlich weniger anfällig für Wirkstoffresistenzen sind. Bisher wurden allerdings nur wenige Inhibitoren entwickelt,

die die p51-p66 Interaktion effektiv verhindern. Zu diesen gehören Peptide, die von den Protein-Protein-Grenzflächen abgeleitet wurden [35, 97]. Die Verwendung von kleinen Molekülen als Modulatoren der Protein-Protein-Wechselwirkungen bereitet in der Anwendung mehrere Probleme [10]. Zum einen ergaben Untersuchungen, dass die Ausdehnung der Grenzfläche in Proteinkomplexen in der Regel größer als 1100 \AA^2 ist [95] und damit die potenzielle Bindungsfläche kleiner Moleküle um ein Vielfaches übersteigt. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Tatsache, dass die Grenzflächen oft relativ eben sind und daher möglicherweise keine Bindungsstellen für kleine organische Moleküle aufweisen. Um so überraschender war es, in dieser Arbeit zwei niedermolekulare Moleküle selektionieren und charakterisieren zu können, die einen Einfluss auf die Protein-Protein-Interaktion der Reversen Transkriptase haben.

Die chemische Datenbank ASINEX wurde von der Gruppe um Prof. Massa virtuell durchgemustert (*Molecular Modelling* Studien), um Moleküle zu identifizieren, die mit erhöhter Wahrscheinlichkeit im Bereich der Tryptophane 401 und 410 der p66 Untereinheit der HIV-1 RT binden. Aus den Dimerisierungsstudien (5.1) wurde klar, dass diese Aminosäuren in Wechselwirkung mit den für die Stabilität des Dimers wichtigen Aminosäuren Lysin 331 und Asparagin 363 stehen. Die ausgewählten niedermolekularen Moleküle wurden in dieser Arbeit biochemisch charakterisiert. Die Substanz MAS 1 konnte die Reassoziationsrate der beiden Untereinheiten deutlich (um ca. 50 %) reduzieren. Der IC_{50} betrug ca. $316 \mu\text{M}$. Allerdings konnte kein Einfluss auf die Polymeraseaktivität der RT nachgewiesen werden. Außerdem war es nicht möglich, das dimere Protein mit MAS 1 aktiv zu dissoziieren. Diese Daten lassen vermuten, dass die MAS 1-Bindung nur möglich ist, wenn die Untereinheiten separat vorliegen. Die Bindungsstelle an Trp 401 und 410 ist im Dimer nicht zugänglich, wie aus den Interaktionen des Tryptophan-Clusters deutlich wird. Beide Tryptophane sind an extensiven Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt. Der Hot-Spot-Theorie folgend, sind die Protein-Protein-Grenzflächen zudem vom Lösungsmittelzugang abgeschirmt. Die Interaktion der Untereinheiten ist in Anwesenheit des Substrats (Primer/Template) stabilisiert [34, 36, 37]. Dies könnte erklären, warum die reduzierte Dimerisierung in Anwesenheit von MAS 1 sich nicht im Polymerasetest widerspiegelt. Vorstellbar ist, dass durch Anwesenheit des Substrats (im Polymerasetest in mikromolaren Konzentrationen anwesend) die Dimerisierung verstärkt wird. MAS 1 könnte aufgrund der Substratbindung verdrängt werden, wenn sich die Bindungsstellen für beide Moleküle überlappen. Das Substrat weist eine affine Bindung (K_d von 1–2 nM) an die HIV-1 RT auf, sodass ein niederaffiner Ligand verdrängt werden würde.

Mit MAS 0 konnte ein niedermolekulares Molekül identifiziert werden, das neben einer Beeinträchtigung der Reassoziationsrate (ca. 30 % Verminderung des Dimeranteils) zusätzlich einen Einfluss auf die Polymeraseaktivität ausübt. Die Restaktivität des Enzyms

(450 pM) lag bei einer MAS 0 Konzentration von 80 μM bei ca. 30 %. Interessant ist die Tatsache, dass die Wirkung von MAS 0 auf die dimere Form der RT nur dann auftritt, wenn über längere Zeiträume inkubiert wird (frühester gemessener Zeitpunkt hier: 16 h). Mehrere Erklärungsansätze können aufbauend auf diesen Ergebnissen diskutiert werden. Zum einen wäre es denkbar, dass MAS 0 neben der Bindungsstelle im Tryptophan-Cluster eine alternative Bindungsstelle besitzt, über die die Modulation der Polymeraseaktivität hervorgerufen wird. So ist es verschiedenen NNRTIs möglich, die RT Dimerisierung zu beschleunigen oder die dimere Form zu destabilisieren [141], ohne jedoch im Grenzflächenbereich zu binden. Für den Fall einer unabhängigen zweiten Bindungsstelle für MAS 0 wäre zu erwarten, dass sich unterschiedliche IC_{50} -Werte für die Reassoziierung und Polymeraseaktivität ergeben. Diese stimmten jedoch gut überein (64 μM versus 39 μM). Zusätzlich ist eine Wirkung von MAS 0 auf die enzymatische Aktivität des Heterodimers nach kurzen Inkubationszeiträumen nicht nachweisbar. Würde MAS 0 ausschließlich als Polymeraseinhibitor wirken (wie beispielsweise der NNRTI BB-NH, [3, 15]) sollte aufgrund der Bindung eine umgehende Wirkung einsetzen. Aufgrund dieser Ergebnisse können jedoch zwei Bindungsstellen ausgeschlossen werden. MAS 0 kann keine aktive Dissoziation hervorrufen, durch die die Ergebnisse aus den Polymerasetests erklärt werden könnten. Möglicherweise kann MAS 0 jedoch bei Bindung an die HIV-1 RT eine Konformationsänderung hervorrufen, die die Polymeraseaktivität und Dimerisierung negativ beeinflusst. Diese Bindungsstelle wäre im monomeren Zustand zugänglich bzw. während der dynamischen Strukturveränderung des Proteins. Eine Wirkung zeigt sich daher erst nach mehreren Stunden, da sich nur unter diesen Bedingungen eine Bindung an die übergangsweise zugängliche p66 UE einstellen könnte.

Die Untersuchungen zur Spezifität zeigten zum einen, dass sich die Wirkung von MAS 0 auf die Polymeraseaktivität der Reversen Transkriptase des HIV-Virus beschränkt. Lentivirale Polymerasen, die nicht aus Primaten-Viren isoliert wurden (EIAV RT) bzw. Polymerasen anderer Organismen (*E. coli*), wurden nicht beeinträchtigt. Als Grund für die beobachtete Spezifität kann die Anwesenheit des Tryptophan-Clusters herangezogen werden, das bei lentiviralen RTs der Primaten (wie HIV-1 und HIV-2) hoch konserviert ist [148], bei anderen lentiviralen RTs (wie EIAV) jedoch nicht auftritt.

Wie in Abbildung 5.1 zu erkennen, sind die für die Interaktion der Untereinheiten essenziellen Aminosäuren in der Sequenz der HIV-1/2 RT identisch. Zusätzlich ist die dreidimensionale Anordnung dieser Aminosäuren in der Struktur beider RTs sehr ähnlich (Abbildung 5.1), sodass die Bindung der niedermolekularen MAS-Substanzen an beide RTs wahrscheinlich ist. Die HIV-2 RT ist im Vergleich zur HIV-1 RT um den Faktor 10 stabiler [37], sodass Modulatoren der Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb der HIV-2 RT eine höhere Affinität zeigen müssten, um einen zu HIV-1 vergleichbaren

Effekt hervorzurufen. Dissoziationsexperimente mit der EIAV-RT lassen ebenfalls vermuten, dass eine höhere Dimerstabilität für dieses Enzym vorliegt [143]. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass die Modellierungsstudien an der HIV-1 RT durchgeführt wurden. So ist es erklärbar, dass die MAS-Substanzen eine geringere Auswirkung auf die Aktivität der verwandten, aber nicht identischen HIV-2 RT und EIAV-RT zeigten.

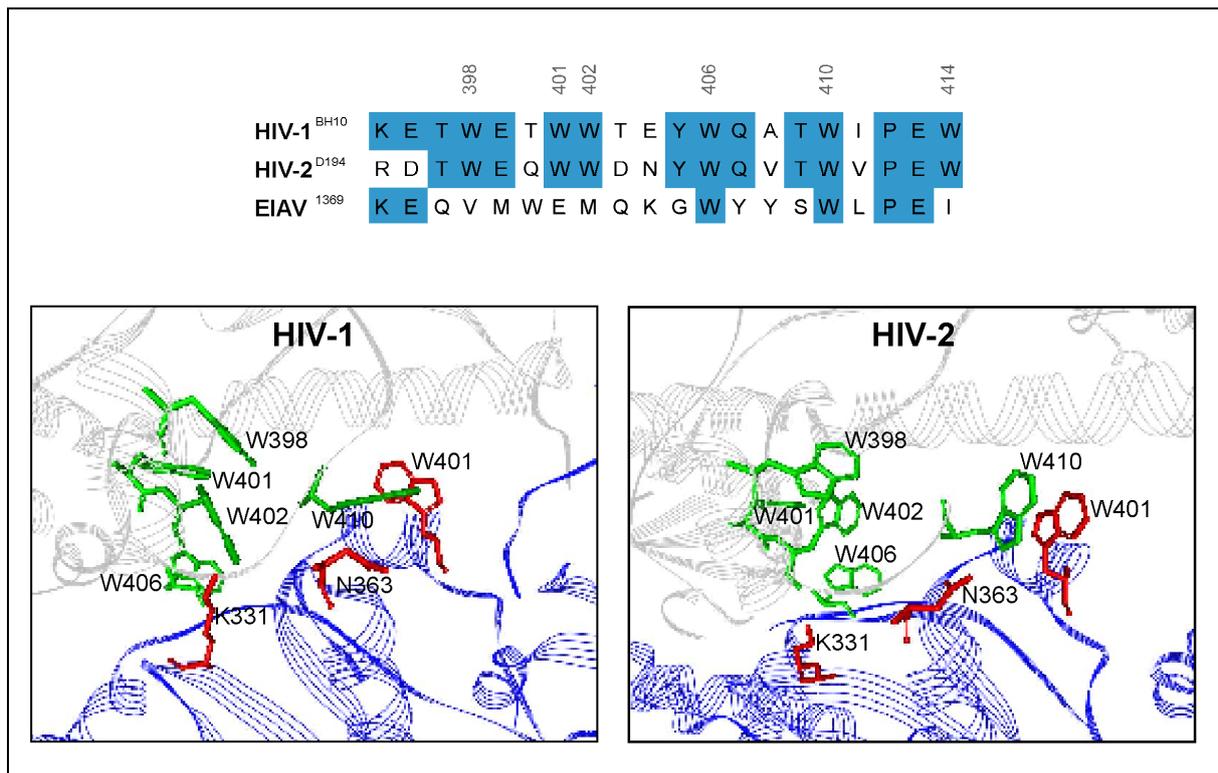


Abbildung 5.1: **Sequenz- und Strukturvergleich des Tryptophan-Clusters lentiviraler Reverse Transkriptasen.** Die konservierten Aminosäuren sind blau unterlegt. Aminosäuren der p66 UE (grau) sind in grün, Aminosäuren der p51 UE (blau) in rot dargestellt (Struktur HIV-1 RT: 1RTH, Struktur HIV-2 RT: 1MU2).

Als Dimerisierungsinhibitoren sind in der Literatur Peptide (p7 und PepA) und verschiedene NNRTI-Derivate diskutiert [140, 141]. Die Peptide können eine aktive Dissoziation der RT einleiten [97], während die NNRTI-Derivate BBNH und TSAO lediglich die Stabilität der RT beeinflussen, ohne jedoch eine Dissoziation hervorzurufen [140]. Die NNRTI-Derivate wurden allerdings nicht in einem Reassoziationsansatz überprüft. Allerdings scheint eine Beeinträchtigung der Reassoziations durch diese Moleküle un-

wahrscheinlich, da die Autoren eine Bindungsstelle nahe der NNRTI-Bindungstasche vorschlagen. Die Bindung könnte eine Konformationsänderung bewirken, die sich auf die Aktivität und Stabilität auswirkt, aber nicht ausreichend für eine aktive Dissoziation ist. Verschiedene Vertreter der Klasse der N-Acyl Hydrazone inhibieren Polymerase-, RNase H-Aktivität oder beide enzymatischen Funktionen der RT - der IC_{50} für BBNH liegt bei $2,5 \mu\text{M}$ (Polymeraseaktivität) bzw. $3,5 \mu\text{M}$ (RNase H Aktivität). Daher sind die MAS-Substanzen neben den peptidischen Inhibitoren die bisher einzigen Moleküle, die die Reassoziaton der RT beeinflussen. Allerdings ist beispielsweise der BBNH-Inhibitor mit einem IC_{50} von $2,5 \mu\text{M}$ ein potenterer Inaktivator der Polymeraseaktivität.

Die hier vorgestellten Substanzen können als Leitstrukturen zur weiteren Optimierung der Bindungs- und Inhibitionseigenschaften angesehen werden. Es sei daran erinnert, dass beide Substanzen die Lipinsky-Regeln erfüllen, sodass eine zelluläre Aufnahme sehr wahrscheinlich scheint und damit Importprobleme wie bei Nukleinsäurewirkstoffen oder peptidischen Inhibitoren nicht auftreten. Für verschiedenste niedermolekulare Moleküle konnte gezeigt werden, dass eine Modifizierung der Leitstruktur in vielen Fällen zur Optimierung der Bindung führen ohne dabei an Spezifität zu verlieren. Zwei solche niedermolekulare Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen werden bereits klinisch eingesetzt [110].

Die hier charakterisierten Substanzen können somit tatsächlich die Dimerstabilität der HIV RT beeinflussen und haben eine Auswirkung auf die Polymeraseaktivität. Die Daten deuten darauf hin, dass der in Computerstudien berechnete Bindungsmodus über die Tryptophane 401 und 410 der p66 Untereinheit von den MAS-Substanzen tatsächlich eingenommen wird und dieser rationale Ansatz damit erfolgreich war. Erstmals konnten in dieser Arbeit somit niedermolekulare Inhibitoren der Dimerisierung beschrieben werden.

5.3 Peptidische Inhibitoren

5.3.1 Kurzkettige Peptide zeigen keinen Effekt hinsichtlich der Dimerstabilität der RT

Die Wechselwirkung multimerer Proteine kann oft durch Peptide beeinflusst werden, die von den Protein-Protein-Grenzflächen abgeleitet wurden. Für die HIV-1 RT wurde ein 10-mer Peptid beschrieben, dessen Sequenz einem Teilbereich des Tryptophan-Clusters der p66 UE entspricht. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich Peptidsequenzen, die sich ebenfalls im Tryptophan-Cluster finden, als kompetitive peptidische Inhibitoren wirken können. Die Peptidlänge wurde auf 6 bis 9 Aminosäuren beschränkt, da kürze-

re Sequenzen hinsichtlich Applikation und Synthese einfacher zu handhaben sind. Der untersuchte Sequenzbereich reicht von der Aminosäure 400 bis 411, in dem sich drei Tryptophane und ein Tyrosin finden. Tryptophane und Tyrosine sind Aminosäuren, die verstärkt an der Ausbildung von Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind und daher innerhalb von Peptidsequenzen die erforderlichen Wechselwirkungen mit Proteinen eingehen können.

Für alle Peptide wurde überprüft, ob sie einen Einfluss auf die Ausbildung des Dimers und die Polymeraseaktivität der RT ausüben. In allen Fällen konnte keine reduzierte Dimerbildung verzeichnet werden. Auch die Polymeraseaktivität war nicht beeinträchtigt. Ähnliche Ergebnisse lieferten Experimente mit 6-mer Peptiden (ESP-Familie), die den Aminosäuren 409–413 entsprechen.

Überlappende Peptidsequenzen innerhalb des Tryptophan-Clusters wurden bereits von Morris *et al.* auf ihre Wechselwirkung mit der RT untersucht [97]. Die Affinität des Peptids p7 zur RT betrug 240 nM. Wurde das Peptid p7 um N-terminale Aminosäuren in der RT-Sequenz erweitert, sank die Affinität der Peptide um den Faktor 10. Erfolgte eine C-terminale Erweiterung, lag der K_d sogar im zweistelligen mikromolaren Bereich. Aminosäuren, die sich an die p7 Sequenz in Richtung C-Terminus anschließen, tragen offensichtlich nicht zur Wechselwirkung des Peptids mit der RT bei. Neue Studien von Depollier *et al.* zeigen zusätzlich [29], dass das Peptid p7 nicht als kompetitiver Inhibitor wirkt, sondern in einer Tasche zwischen Finger- und Verbindungsdomäne der p51 UE bindet. Diese Bindung induziert eine Konformationsänderung in der RT-Struktur, die sich in einer reduzierten Dimerstabilität äußert.

Die hier gewählten Peptide vermögen nicht, kompetitiv an die p51 UE zu binden. Zusätzlich fehlen offensichtlich die strukturellen Voraussetzungen und die nötigen Wechselwirkungen spezifischer Aminosäureseitenketten, um wie p7 die hydrophobe Bindungstasche in der p51 UE zu besetzen.

Kontakte zwischen der Daumendomäne von p51 und der RNaseH-Domäne von p66 tragen zusätzlich zur Ausbildung der dimeren RT-Struktur bei. Das Peptid PepA, das von der Daumendomäne abgeleitet wurde, reduziert die Polymeraseaktivität des Enzyms [101]. Die Autoren vermuteten, dass PepA eine Konformationsänderung induziert und dadurch die enzymatische Aktivität des Enzyms beeinträchtigt wird, da das Peptid keinen Einfluss auf die Dimerstabilität hatte. In dieser Arbeit wurden zusätzlich Peptide (TR-Peptide) untersucht, die von der Grenzfläche zwischen RNaseH- und Daumendomäne (p51) abgeleitet wurden, hier aber der Sequenz der RNaseH-Domäne entsprachen (AS 534-554). Die p51 UE unterstützt die für die enzymatischen Aktivitäten essentielle dreidimensionale Anordnung des Heterodimers. Eine kompetitive Bindung der von der RNaseH-Domäne abgeleiteten Peptide würde den Einfluss der p51 UE verrin-

gern, was an der veränderten Aktivität des Enzyms auszumachen wäre. Die in dieser Arbeit untersuchten Peptide beeinträchtigten jedoch weder Polymerase- noch RNaseH-Aktivität der RT. Eine Erklärung für die Unwirksamkeit der Peptide könnte der zweistufige Assoziationsprozess der RT Untereinheiten liefern [36, 37]. Der schnellen Assoziation der Monomere folgt eine langsame Konformationsänderung, die zum enzymatisch aktiven Dimer führt. PepA interferiert mit dieser Konformationsänderung. Die schnelle Assoziation wird wahrscheinlich über das Tryptophanmotiv in den Verbindungsdomänen vermittelt. Nach diesem Schritt liegt bereits das Heterodimer vor. Die Sequenzen der TR-Peptide befinden sich im Vergleich zur PepA Sequenz nicht an der Oberfläche des Proteins. Die Aminosäuren könnten somit bereits in Wechselwirkungen mit p51 involviert und der Bereich unzugänglich für Lösungsmittel sein. Die p51 UE würde daher nicht mit den angebotenen freien Peptiden interagieren können, da sie bereits in Kontakt mit der p66 UE steht und die freien Peptide keinen Zugang zu den Aminosäuren der Grenzflächen hätten. Für PepA ist zudem nicht auszuschließen, dass es wie p7 nicht als kompetitiver Partner zur p66 UE agiert, sondern durch eine Bindung innerhalb der RT-Sequenz die erwähnte Konformationsänderung hervorruft. In diesem Fall gilt für die RT-Peptide das Gleiche wie für die ESP- und P-Peptide: die Eigenschaften der gewählten Peptide stimmen nicht mit den Anforderungen für die Bindung innerhalb definierter Furchen und Taschen in der RT-Struktur überein, sodass die Ausbildung einer Wechselwirkung nicht möglich ist.

Zusätzlich wäre es denkbar, dass die in dieser Arbeit unternommenen Anstrengungen, verschiedenste Peptid-RT-Wechselwirkungen zu untersuchen, an den falschen Versuchsbedingungen scheiterten. Obwohl die Pufferzusammenstellung und Methodik weitgehend den veröffentlichten Daten folgten, können u.U. kleinste Änderungen ein Scheitern des Experiments hervorrufen, die mit den hier gewählten Methoden allerdings nicht nachzuvollziehen waren. Abschließend bleibt zu verzeichnen, dass die Auswahl von Peptiden als RT-Inhibitoren nicht trivial ist. Methoden, die eine schnelle und zuverlässige Aussage über die direkte Wechselwirkung zwischen Peptid und Protein zuließen, würden diesen Ansatz vorantreiben.

5.3.2 RT-Mutanten, die eine verminderte Bindung des Peptids p7 zeigen, sind in ihren enzymatischen Fähigkeiten eingeschränkt

Die langanhaltende Wirksamkeit eines Inhibitors in der HIV-Therapie ist nur dann wahrscheinlich, wenn der inhibitorische Effekt nicht durch Resistentmutationen aufgehoben werden kann oder entsprechende Mutationen die Replikationsfähigkeit des Virus zu stark beeinträchtigen. Wenn Aminosäureaustausche innerhalb des Zielmoleküls den inhibito-

rischen Effekt minimieren können und gleichzeitig die Funktionalität nicht vermindert wird, setzen sich dagegen Resistenzmutationen in der HIV-Population schnell durch. Ist der Mechanismus eines Inhibitors bekannt, können in *in vitro* Experimenten die Auswirkungen möglicher Resistenzmutationen auf die enzymatische Aktivität des Proteins untersucht werden. Für p7 konnte gezeigt werden, dass das Peptid vorrangig mit den Aminosäuren W24 und F61 in der p51 Untereinheit interagiert [29]. Denkbar wäre, dass diese Positionen während einer Resistenzentwicklung mutiert vorliegen. Daher wurden diese Aminosäuren in der p66, in der p51 oder in beiden Untereinheiten mutiert, um eventuelle Auswirkungen auf die Polymerase- und RNaseH-Aktivität des Enzyms nachzuweisen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Aminosäureaustausch an Position 24 der p66 Untereinheit die RNaseH-Aktivität um 30 % reduziert. Dagegen wirken sich die Mutationen sowohl an Position F61 als auch an Position W24 in der p66 Untereinheit negativ auf die Polymeraseaktivität aus. In der Doppelmutante ist die Polymeraseaktivität um 60 % reduziert. Dabei ist zu beachten, dass im Virus p51 aus der p66 Untereinheit hervorgeht und damit alle in p66 vorhandenen Mutationen auch in p51 wiederzufinden wären. Eine Mutation dieser hochkonservierten Aminosäuren hat daher mehrfach negative Auswirkungen. Zum einen wird die Stabilität des Dimers beeinträchtigt [29], da beide Aminosäuren eine Wechselwirkung mit dem Tryptophan-Cluster der p66 UE eingehen und damit zur Stabilität des Dimers beitragen. Zum anderen ist, wie Fisher *et al.* zeigen konnten [47], bei Mutation des Phenylalanins die Prozessivität der RT reduziert. Zusätzlich sind, wie in dieser Arbeit gezeigt, Polymerase- und RNaseH-Aktivität der RT reduziert, wenn beide Mutationen vorliegen. Langzeitexperimente müssen klären, ob die beschriebenen RT-Mutationen bei Applikation des Peptids auftreten oder die Beeinträchtigung der Struktur und Aktivität der RT durch die Aminosäureaustausche das Aufkommen von resistenten Varianten verzögern oder sogar verhindern würde.

5.4 Nukleinsäureinhibitoren

Als Aptamere werden kurzkettige RNAs und DNAs bezeichnet, die aus einer *in vitro* Selektion (SELEX: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) stammen. Ausgehend von einer randomisierten Nukleinsäurebibliothek werden während des Selektionsprozesses hochaffine Liganden angereichert, die äußerst spezifisch das Zielmolekül binden und ggf. mit einer vorhandenen enzymatischen Aktivität interferieren [150]. Mit dieser Methode konnten gegen die Reverse Transkriptase gerichtete DNA- und RNA-Aptamere identifiziert werden [2, 18, 30, 72, 136, 151]. In dieser Arbeit wurden Aptamere aus einer *in vitro* Selektion mit der p51 UE der RT als Zielprotein und bereits beschriebene inhibitorische Aptamere näher charakterisiert.

5.4.1 Nukleinsäuren als Dimerisierungsinhibitoren

Für verschiedene Molekülklassen konnte ein Einfluss auf die Dimerisierung der RT nachgewiesen werden. Zu ihnen zählen Peptide [97, 101], nicht nukleosidische RT Inhibitoren [64], Hydrazone [140], organische Lösungsmittel wie beispielsweise Acetonitril [37], Antikörper [119] und, wie in dieser Arbeit gezeigt, niedermolekulare Substanzen. Für Nukleinsäuren (in dem zitierten Fall das Primer/Template-Substrat) konnte bisher lediglich nachgewiesen werden, dass sie die Dimerstabilität der RT erhöhen [37]. Denkbar wäre jedoch auch, dass Nukleinsäuren über Wechselwirkungen mit den jeweiligen Untereinheiten die Ausbildung des Heterodimers beeinträchtigen.

In diesem Zusammenhang wurde ein kombinatorischer Ansatz gewählt, bei dem die p51 UE als Zielprotein eingesetzt wurde. Um auszuschließen, dass Nukleinsäureliganden (Aptamere) angereichert werden, die an die im Heterodimer zugänglichen Bereiche der p51 UE binden, wurde zunächst eine sogenannte Gegenselektion mit der dimeren Form der RT durchgeführt. Die daraus resultierende RNA-Nukleinsäurebibliothek wurde mit der p51 Untereinheit inkubiert und die bindenden Nukleinsäuren der nächsten Selektionsrunde zugeführt. Nach neun Zyklen war die für ein SELEX-Experiment typische exponentielle Steigerung des gebundenen Nukleinsäureanteils zu verzeichnen. Die anschließend sequenzierten Aptamere konnten in drei Familien unterteilt werden, die in ihrer Nukleotidabfolge Ähnlichkeiten untereinander aufwiesen. Die Sequenzen, die am häufigsten im selektierten Nukleinsäurepool auftraten, wurden in ihren Bindungseigenschaften näher charakterisiert. Das Aptamer 8.7 wies keine Bindung an die dimere Form und die p51 UE auf. Die Aptamere 9.2 und 9.9 banden an die p51 UE. Die Affinität lag jedoch im mikromolaren Bereich. Das Aptamer 9.2 zeigte zusätzlich eine schwach affine Wechselwirkung mit dem RT-Heterodimer. Obwohl die Sekundärstrukturen der selektierten RNAs teilweise Ähnlichkeiten zur Struktur des Primer/Template-Substrats hatten, war eine Wechselwirkung mit der RT nicht vorhanden. Aptamere zeigen typischerweise Affinitäten im unteren nanomolaren Bereich. Die hier ermittelten hohen Dissoziationskonstanten weisen somit eher auf eine unspezifische Wechselwirkung zwischen RNA und Protein hin. Daher war es nicht verwunderlich, dass die Bindung der Nukleinsäuren die Ausbildung des Heterodimers nicht beeinflussten.

Liegt die p51 UE im Komplex mit der p66 vor, konnte nachgewiesen werden, dass die p51 UE Kontakte zur gebundenen Nukleinsäuren ausbildet. Vor allem die Aminosäuren der p51 Fingerdomäne interagieren mit einzelnen Nukleotiden im Template-Strang eines gebundenen Substrats [63]. Die Struktur der RT im Komplex mit dem Pseudoknoten RNA-Aptamer zeigt ebenfalls eine Beteiligung der p51 UE an der Nukleinsäurebindung [67]. In diesem Fall werden die Kontakte von Aminosäuren in der Finger- und Verbin-

dungsdomäne vermittelt. In der Literatur wurde für die separate, monomere p51 UE bisher noch keine Nukleinsäurebindefähigkeit nachgewiesen. Denkbar wäre, dass der hydrophobe Charakter der p51-p66 Grenzflächen eine Nukleinsäurebindung nicht erlaubt und die Selektion aus diesen Gründen nur schwach affine Liganden hervorbrachte.

5.4.2 Das DNA-Aptamer RT1t49 zeigt eine hohe Affinität zur HIV-1 RT

Das in dieser Arbeit verwendete DNA-Aptamer (RT1t49) wurde von Schneider und Kollegen selektiert [136], die einen K_d von 1 nM und einen K_i von 300 pM beschrieben haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das DNA-Aptamer hinsichtlich Bindung und Inhibitionsaktivität näher untersucht, um die Daten in weiterführenden Studien mit mutanten RTs vergleichen zu können. Dabei stellte sich heraus, dass die Bindungseigenschaften des Aptamers deutlich besser als bisher angenommen sind. Die Dissoziationskonstante lag bei 123 pM und ist damit um den Faktor 10 kleiner als der von Schneider bestimmte K_d -Wert. Bisher wurde angenommen, dass RNA-Aptamere aufgrund der vielseitigeren Faltungsmöglichkeiten intensivere Wechselwirkungen mit Proteinen eingehen können. Im Vergleich zum hochaffinen RNA-Aptamer bindet RT1t49 jedoch nur um ca. den Faktor 3 schlechter an die RT. Die experimentellen Bedingungen wurden zuvor mit der Pseudoknoten-RNA überprüft. Die Daten stimmten mit den veröffentlichten Dissoziationskonstanten sehr gut überein. So ist davon auszugehen, dass die hier bestimmten Dissoziationskonstanten korrekt sind. Damit wurde erstmals gezeigt, dass ein DNA-Aptamer eine vergleichbare Affinität wie ein RNA-Aptamer zur RT besitzt.

Die sehr guten Bindungseigenschaften des Aptamers reflektierten sich in der Inhibitionsfähigkeit. Für das Aptamer RT1t49 konnte ein IC_{50} von 8 nM bestimmt werden und befindet sich damit im gleichen Konzentrationsbereich wie der IC_{50} der Pseudoknoten-RNA. Beide Aptamere konnten die RNaseH-Aktivität reduzieren. Die IC_{50} -Werte lagen etwa um den Faktor 8 höher. RT1t49 und die Pseudoknoten-RNA zeichnen sich unter allen bisher selektierten RT-Aptameren [2, 18, 60, 72, 142] durch die hohe Affinität und ausgezeichnete Inhibitionsfähigkeit aus, die beide enzymatische Aktivitäten umfasst. Dass die Inhibitoren beide enzymatischen Aktivitäten beeinflussen, ist nicht verwunderlich, da die kompetitive Bindung über die Nukleinsäurebindungsfurche erfolgt und dadurch beide aktiven Zentren blockiert werden.

5.4.3 NRTI-resistente RTs zeigen keine Resistenz gegenüber der Pseudoknoten-RNA und RT1t49

Das HI-Virus bringt - bedingt durch seine hohe Mutationsrate - immer wieder RT-Varianten hervor, die keine Sensitivität gegen die eingesetzten nukleotidischen und nicht nukleotidischen Inhibitoren zeigen. Wirkstoffen, die resistente RT-Varianten binden und inhibieren, gilt daher besonderes Interesse. Vor diesem Hintergrund wurde überprüft, ob RT1t49 und die Pseudoknoten-RNA die Polymeraseaktivität verschiedener NRTI-resistenter RT-Mutanten inhibieren können. In allen Fällen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Affinität zur RT als auch die Inhibitionsfähigkeit vergleichbar mit dem RT-Wildtyp waren. Im Vergleich dazu wurde von Fisher *et al.* gezeigt, dass die Mutation K65R, die in ddI/ddC-resistenten RT-Populationen zu finden ist, einen um den Faktor 5 höheren IC₅₀-Wert für das Aptamer RT1t59 hervorruft [49].

Für die Pseudoknoten-RNA ist bekannt, dass die Interaktion der Nukleinsäure vor allem über Aminosäuren in der Daumen- und Fingerdomäne der p66 UE und Finger- und Verbindungsdomäne der p51 UE vermittelt wird [67]. Mutationen im Bereich des katalytischen Zentrums, die typischerweise für die Resistenzentwicklung gegenüber nukleosidischen RT-Inhibitoren zu finden sind, scheinen die Gesamtstruktur der RT nicht zu beeinflussen, sodass die Aptamere alle notwendigen Interaktionen zur Bindung mit der RT ausbilden können.

Allgemein wird angenommen, dass für eine Resistenz gegenüber Aptameren mehrere Mutationen vorliegen müssen, da die Nukleinsäure eine große Bindungsfläche aufweist. Für das Aptamer RT1t49 wurde jedoch gezeigt, dass bereits zwei RT-Mutationen (an Position N255 und N265) die Wirksamkeit des Aptamers deutlich herabsetzen [48]. Im Gegenzug dazu ist die Polymerase- und RNaseH-Aktivität negativ beeinflusst, sodass die Partikelproduktion stark beeinträchtigt wird [48, 49]. Zusätzlich wurde von den Autoren nachgewiesen, dass die erwähnten RT-Mutationen keine Kreuzresistenz zur Pseudoknoten-RNA oder zu gängigen nukleosidischen RT-Inhibitoren zeigten. Im Zellkulturrexperiment konnte das Pseudoknoten-Aptamer intrazellulär ohne Verlust der inhibitorischen Fähigkeiten exprimiert werden. Die Produktion von viralen Partikeln konnte in Anwesenheit des Aptamers um 75 % gesenkt werden [21]. Die Autoren vermuten, dass das Aptamer, im Komplex mit der RT, in die viralen Partikel verpackt wird und so auch in den Zielzellen eine Inhibition auftreten kann. Vor diesem Hintergrund bleibt der Einsatz von Nukleinsäureinhibitoren weiterhin interessant. Mehrere Gründe empfehlen unter den neu gewonnen Erkenntnissen den Einsatz des DNA-Aptamers als RT-Inhibitor:

- DNAs weisen eine höhere Nukleaseresistenz auf als RNAs und sind damit im zel-

lulären Umfeld stabiler.

- Der inhibitorische Effekt des DNA-Aptamers (IC_{50} von 8,8 nM) ist vergleichbar mit dem des RNA-Aptamers (IC_{50} von 3,6 nM)
- Desoxynukleotide können kostengünstiger synthetisiert werden.
- Werden die Oligonukleotide synthetisch hergestellt, ist leicht eine Stabilisierung der Nucleinsäuren über Modifikationen am Zucker zu erreichen.

Neben der sehr guten Wirksamkeit und Verträglichkeit von Nucleinsäurewirkstoffen bleibt aber auch in Zukunft das Problem des Zellimports zu lösen. Nucleinsäuren können die Zellmembran nicht überwinden und müssen daher in die Zelle eingeschleust werden. Momentan werden neben rekombinanten viralen Systemen vor allem synthetische Import-Systeme wie Liposomen, Polymere und Peptide eingesetzt [155].

5.4.4 Ist die rationale Entwicklung von p/t-ähnlichen Nucleinsäureinhibitoren möglich?

Nucleinsäuren, die über einen ca. 18 nt langen, doppelsträngigen Bereich verfügen, können als Primer/Template-ähnlich angesehen werden. Mit dieser Struktur ähneln sie dem Initiationskomplex aus tRNA und PBS. Experimente mit synthetischen Substraten zeigten, dass die Bindungsaffinität der DNA/DNA-Hybride unabhängig von der Sequenz der verwendeten 18/36-Mere ist (Daten nicht gezeigt). Auch RT1t49 wurde von den Autoren in die Gruppe der substratähnlichen Nucleinsäureinhibitoren eingeordnet. Allerdings besitzt dieses Aptamer am 3'-Terminus eine zweite, zusätzliche Stammstruktur. Die gegen die p51 UE selektierten RNA-Aptamere 8.7 und 9.2 und die RNA 7.7, die einem SELEX-Experiment mit Luziferase als Zielprotein entstammt, weisen ebenfalls eine p/t-ähnliche Struktur auf. Obwohl die Aptamere diese Strukturähnlichkeiten zeigten, unterschieden sie sich in ihren Bindungseigenschaften sehr deutlich. Das Aptamer 8.7 vermochte nicht an die RT zu binden. Für die Aptamere 7.7 und 9.2 konnte eine Affinität zur RT im oberen nanomolaren Bereich ermittelt werden, die sich um den Faktor 2 unterschied. De Stefano *et al.* konnten p/t-ähnliche DNA-Aptamere selektieren, deren Affinitäten zur RT im unteren nanomolaren Bereich lagen [30]. Der Selektionsprozess brachte in diesem Fall ausschließlich Liganden hervor, die an ihrem 3'-Ende über ein Sequenzmotiv von mindestens sechs hintereinanderliegenden Guanosinen verfügen. Sequenzen, die GC-reiche Regionen mit aufeinanderfolgenden Guanosinen beinhalten, zeigen entgegen der üblichen B-Form für DNA/DNA-Hybride die A-Form, wie sie auch im aktiven Zentrum der RT vorliegt. Die Autoren schließen aus diesen Beobachtungen, dass die strukturelle

Komponente entscheidend für die gute Bindungsfähigkeit der gezeigten Aptamere ist und in diesem Fall die Sequenz eine untergeordnete Rolle spielt. Die zuvor diskutierten Daten deuten dagegen darauf hin, dass eine ähnliche Struktur nicht notwendigerweise vergleichbares Bindungsverhalten impliziert.

Trotzdem bleibt die Struktur ein entscheidender Parameter, wie aus den Inhibitionsdaten des verkürzten RT1t49-Aptamers (RT1t33) hervorgeht. Fehlt ein Teil der Stammstruktur am 5'-Ende, verliert das Aptamer an Inhibitionspotenz. Wird die 3'-terminale Stammstruktur entfernt (RT1t30), ist eine um den Faktor 250 verschlechterte Bindung an die RT zu verzeichnen [136].

Die Konzeption von inhibitorischen Nukleinsäureliganden ist über rationale Methoden schwierig, da die Affinität sowohl von Sequenz als auch Struktur bestimmt wird. Beide Parameter lassen sich im kombinatorischen Ansatz variieren, sodass dieser Ansatz auch in Zukunft erfolversprechendere RT-Liganden hervorbringen wird.

5.5 Die Wechselwirkung der RT mit dem NC-Protein als potenzielle Inhibitionsmöglichkeit

Interaktionen zwischen Biomolekülen stellen oft regulatorische Weichen dar. Aktivitäten können über Protein-Protein- oder Protein-Nukleinsäurewechselwirkungen an- oder abgeschaltet werden. Im Hinblick auf virale Infektionen kann die Beeinflussung solcher Wechselwirkungen zwischen viralen bzw. viralen und zellulären Molekülen als therapeutische Interventionsmöglichkeit genutzt werden.

Die Tatsache, dass sowohl die Reverse Transkriptase als auch das Nucleocapsid-Protein während des viralen Lebenszyklus vorrangig Nukleinsäure-assoziiert vorliegen und das NC-Protein innerhalb der RT-katalysierten reversen Transkription eine Schlüsselfunktion einnimmt, weist auf eine Wechselwirkung der beiden Proteine hin, die bereits in der Literatur diskutiert wurde [38]. Die Chaperonfunktion des NCs wurde als Erklärung für das Überwinden sogenannter *pausing sites* innerhalb der Template-Sequenz herangezogen [89]. Die Polymerisation ist an sekundärstrukturhaltigen Template-Sequenzen verzögert, da vor dem Nukleotideinbau zunächst die vorhandenen Watson-Crick-Basenpaare aufgewunden werden müssen [162]. Zusätzlich vermittelt das NC-Protein die Strangtransfer-Reaktion innerhalb der reversen Transkription, indem es die Struktur der beteiligten Nukleinsäuren destabilisiert, die RNasH-Aktivität stimuliert [108] und die intramolekulare Rückfaltung des initiierten (-) DNA-Stranges verhindert [91]. Welchen Einfluss die NC-RT-Wechselwirkung jedoch auf die Einbaukinetik der RT ausübt, ist bisher nicht untersucht.

5.5.1 Das NC-Protein erhöht die Amplitude des RT vermittelten Nukleotideinbaus

Die in dieser Arbeit durchgeführten Einzelnukleotideinbaustudien in Anwesenheit des NCs zeigten, dass das NC-Protein die Amplitude des Nukleotideinbaus erhöht. Die Experimente wurden in Anwesenheit einer Substratfalle durchgeführt, sodass lediglich ein Einbauzyklus studiert wurde. Es zeigte sich, dass bei einem NC zu Nukleotid Verhältnis von 2:1 der größte stimulatorische Effekt auftrat. In der Literatur wurde beschrieben, dass die durch das NC gesteigerte Transfereffizienz bereits bei molaren Verhältnissen von 1:7 bis 1:2 eintritt [85], was dem vermutlich im Virion vorliegenden Verhältnis entspricht. Das NC deckt dort etwa 7 Nukleotide ab. Warum war bei den hier durchgeführten Experimenten ein solch hohes molares Verhältnis nötig? Ein inaktives NC scheidet als Begründung aus, da die genutzten NC-Chargen im Chaperontest vollständige Aktivität zeigten. Stattdessen kommen zwei andere Gründe dafür in Frage. Zum einen werden die Strangtransfer-Reaktionen bei niedrigen Magnesium-Konzentrationen durchgeführt. Millimolare Konzentrationen, wie sie für die Aktivität der RT notwendig sind, üben einen negativen Effekt auf die NC-Aktivität aus (persönliche Mitteilung Y. Mély). Zum anderen könnten die erhöhten NC-Konzentrationen darauf hinweisen, dass der beobachtete Effekt nicht auf die Chaperonaktivität des NCs sondern auf eine direkte Wechselwirkung zwischen NC und RT zurückzuführen ist.

Der stimulierende Effekt war auf ein enges NC-Konzentrations-Spektrum beschränkt. Überstieg das molare Verhältnis die Relation von 4:1, wurde der Nukleotideinbau durch das NC-Protein negativ beeinflusst, wie bereits in der Literatur beschrieben wurde [68, 125].

Für die Einbaustudien wurde ein lineares und ein sekundärstrukturhaltiges Substrat verwendet. Die Erhöhung der Amplitude resultierte beim linearen Primer/Template aus dem gesteigerten $n+2$ Einbau, während beim Hairpin-Substrat der $n+1$ Einbau forciert wurde. Die Bedeutung der unterschiedlichen Verteilung in Abhängigkeit von der Templatestruktur wird in Abschnitt 5.5.3 ausführlicher diskutiert.

5.5.2 Das NC-Proteine stabilisiert den binären RT-Substrat-Komplex

Das NC-Protein erhöhte die Amplitude des RT-vermittelten Nukleotideinbaus. Für diese Beobachtung kamen verschiedene Erklärungen in Frage.

Das NC-Protein ist in der Lage, Nukleinsäuren spezifisch und unspezifisch zu kondensieren [83]. Diese Eigenschaft des NCs könnte in dem hier genutzten Modellsystem dazu

führen, dass der RT-Substrat-Komplex in einem Aggregat vorliegt und die freie Diffusion der RT nach Dissoziation eingeschränkt ist. Die Substratfalle könnte die erleichterte Reassoziaton eines RT- und Substrat-Moleküls nicht verhindern, sodass ein erneuter Einbau stattfinden könnte. Diese Möglichkeit konnte ausgeschlossen werden, da NC-Präparationen, die in ihrer Chaperonaktivität, jedoch nicht in ihrer Nukleinsäurebindungsfähigkeit eingeschränkt waren, keine Amplitudenerhöhung hervorriefen.

Dass eine NC-RT-Wechselwirkung die Polymerisationsrate der RT positiv beeinflusst, kam als weitere Ursache in Frage. In *pre-steady-state* Messungen konnte für das lineare Substrat eine um den Faktor 50 verlangsamte Polymerisationsrate bestimmt werden. Wie schon in der Literatur beschrieben, ist die Polymerisation in Anwesenheit des NCs verlangsamt, da die Nukleinsäure vom NC-Protein geschützt wird. Dieser bereits bestehende Nukleoproteinkomplex verhindert offensichtlich den umgehenden Einbau des nächsten Nukleotids. Im Fall des Hairpin-Substrats war eine Erhöhung der Einbaurate in beiden exponentiellen Phasen um den Faktor 2 messbar. Der störende Effekt des NC-Proteins konnte hier nicht beobachtet werden. Es ist vorstellbar, dass das NC die Stammstruktur aufschmilzt und der Einbau des nächsten Nukleotids erfolgen kann.

Ebenso interessant war die Verteilung der Amplituden in den *pre-steady-state* Experimenten. Während sowohl beim linearen als auch beim Hairpin-Substrat die erste Phase nahezu gleichverteilt war, konnte in der zweiten Phase eine Erhöhung der Amplitude gemessen werden. Im Fall des linearen Substrats verdoppelte sich die Amplitude der zweiten exponentiellen Phase in Anwesenheit des NCs. Die erste, schnelle Phase des Einbaus wird von einem produktiven RT-Substrat-Komplex im Produktstatus (PP) vollzogen. Der produktive Komplex im Eduktstatus (PE) muss zunächst eine Konformationsänderung vollziehen, ehe ein Einbau erfolgen kann, der sich in der zweiten exponentiellen Phase widerspiegelt. RT-Moleküle, die im unproduktiven Komplex mit dem Substrat vorliegen (*dead-end* Komplex), müssen zunächst dissoziieren und neu an das Substrat binden, um einen Einbau katalysieren zu können. Da die Amplitude der ersten Phase in Anwesenheit von NC unverändert blieb, muss die Zunahme der zweiten exponentiellen Phase eine Reduktion der linearen Phase zur Folge haben. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das NC eine Umwandlung des *dead-end* Komplexes in den PE-Komplex vermittelt. Weitere Messungen müssen zeigen, ob diese Ergebnisse zuverlässig sind oder ein Artefakt darstellen.

Eine dritte Möglichkeit – der gesteigerte Einbau aufgrund einer erhöhten Verweildauer der RT am Substrat – konnte in dieser Arbeit mit fluoreszenzspektroskopischen Verfahren überprüft werden. Die Dissoziation des RT-Substrat-Komplexes wurde anhand eines FRET-Signals über die Zeit verfolgt (Bestimmung der *offrate*). Der Vergleich des hier bestimmten dreiphasigen Verlaufs der Dissoziation stand in Übereinstimmung mit Da-

ten, die über Stopped-Flow-Messungen gewonnen wurden [81]. Da die Dissoziationsraten beider Verfahren vergleichbar waren, erwies sich das hier gewählte Verfahren trotz der geringeren zeitlichen Auflösung als zuverlässig. Die Anwesenheit des NC-Proteins verlangsamte den Dissoziationsprozess um den Faktor 100–200, der sich aus der Verlangsamung der zweiten und dritten Phase um jeweils den Faktor 10–20 herleitet. Der binäre RT-Substrat-Komplex wird offenbar durch das NC-Protein stabilisiert, die Verweildauer der RT am Substrat erhöht sich. Die verringerte Dissoziation ermöglichte im Fall des linearen Primer/Template den $n+2$ Einbau.

Eine ähnliche Beobachtung wurde kürzlich von Bampi *et al.* beschrieben [5]. Die Dissoziationsrate wurde in diesem Fall indirekt über den Nukleotideinbau bestimmt. Für die Versuche wurde ein NC-Vorläuferprotein verwendet, das über 16 zusätzliche Aminosäuren verfügt. In Anwesenheit des NCs (1–71) konnte eine zehnfach verringerte Dissoziationsrate bestimmt werden. Allerdings zeigte sich ein einfach exponentieller Verlauf mit einer Rate von $0,059 \text{ s}^{-1}$, was der dritten Phase des in dieser Arbeit beobachteten Dissoziationsprozesses entspricht. Über dieses Verfahren kann lediglich der für die Polymerisationsreaktion geschwindigkeitsbestimmende Dissoziationsschritt verfolgt werden. Die in dieser Arbeit über ein Verdrängungsverfahren bestimmten Raten geben daher einen differenzierteren Einblick in den Dissoziationsprozess und den Einfluss des NCs. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe feststellen, dass die NC-Variante 1–55 keinen Einfluss auf die Dissoziationsrate hatte. Allerdings wurde die Hybridisierung des Primer/Template in Anwesenheit des NCs vorgenommen und anschließend die RT zugefügt. Während in dieser Arbeit zunächst der binäre RT-Substrat-Komplex vorgeformt wurde und erst danach die Inkubation mit dem NC-Protein erfolgte. Diese experimentellen Unterschiede könnten die Diskrepanz zwischen den in der Literatur und in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen erklären.

Für andere virale Proteine konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie die Stabilität des RT-Substrat-Komplexes beeinflussen. Für das Nef-Protein wurde nachgewiesen, dass es die Affinität der RT zu verschiedenen RNAs erhöht, ohne selbst an die Nukleinsäure zu binden [50]. Die Anwesenheit des Nef-Proteins beeinflusste jedoch nicht die Prozessivität der RT.

5.5.3 Der Einfluss des NC-Proteins auf die enzymatische Funktion der RT - ein Modell

Ausgehend von den beschriebenen Daten erhärtet sich die Vermutung einer spezifischen Interaktion zwischen RT und NC. Zusammenfassend soll ein Modell vorgestellt werden, das den Einfluss des NC-Proteins auf den Nukleotideinbau an linearen und se-

kundärstrukturhaltigen Substraten verdeutlicht (siehe Abbildung 5.2).

Im Fall des linearen Substrats bedeckt das NC-Protein die Nukleinsäure und geht gleichzeitig eine Interaktion mit der RT ein. In Anwesenheit von Nukleotiden erfolgt der Einbau an Position $n+1$. Der Einbau ist verlangsamt, da das NC-Protein möglicherweise die Einbauposition verdeckt und eine Neuverteilung erfolgen muss. Während die RT in Abwesenheit des NCs vom Substrat dissoziiert, ist der RT-Substrat-Komplex in Anwesenheit des NCs stabilisiert, sodass ein weiterer Einbau an Position $n+2$ erfolgen kann. Die Anwesenheit des NCs manifestiert sich bei Verwendung des linearen Substrat daher vorwiegend im verstärkten $n+2$ Einbau.

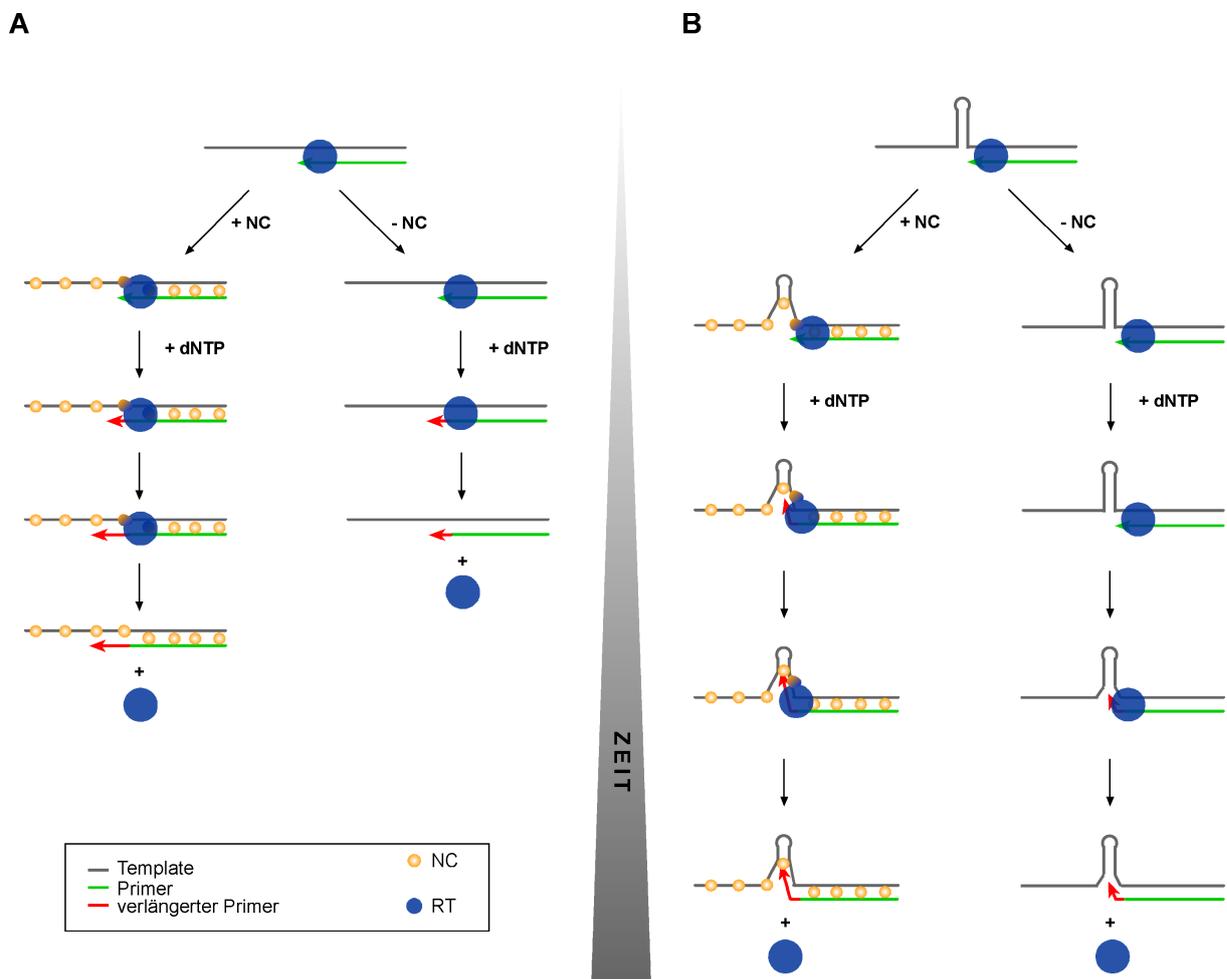


Abbildung 5.2: **Modell – Einfluss des NC-Proteins auf den RT-vermittelten Nukleotideinbau.** Der vorgeschlagene Mechanismus der NC-vermittelten Stimulation des Nukleotideinbaus ist für ein lineares (A) bzw. ein sekundärstrukturhaltiges Substrat (B) gezeigt.

Bevor am Hairpin-Substrat ein Nukleotideinbau erfolgen kann, muss zunächst die Stammstruktur der Hybrids entwunden werden. Die RT kann diesen Prozess selbstständig durchführen, was allerdings zu einer reduzierten Einbaurrate führt. In Anwesenheit des NCs ist es vorstellbar, dass durch die Chaperonaktivität des NCs die Stammstruktur gelöst wird und bei Zugabe des Nukleotids ein sofortiger Einbau möglich wird. Auch hier muss vermutlich eine Neuverteilung des NCs erfolgen, bevor das Nt in den Primerstrang eingebaut werden kann. Anhand der Einbauraten ist zu erkennen, dass der positive Chaperoneffekt die Verlangsamung der Polymerisation aufgrund der NC-Protektion aufwiegt und daher keine verlangsamte Einbaurrate zu verzeichnen ist. Die in Anwesenheit des NCs längere Komplexlebenszeit trägt dazu bei, dass darüberhinaus ein $n+2$ -Einbau stattfinden kann, während der Komplex ohne NC bereits dissoziiert.

Je nach Substrat liegen somit vermutlich unterschiedliche Mechanismen vor, die Anwesenheit des NCs wirkt sich jedoch immer positiv auf den Nukleotideinbau aus: Das „Pausieren“ der RT an Sekundärstrukturelementen wird durch das NC verringert und an linearen Strukturen die Prozessivität der RT erhöht. Zusätzlich wird die Wahrscheinlichkeit eines Falscheinbaus erhöht und die genetische Diversität der proviralen DNA begünstigt. Denkbar wäre auch, dass die Stabilisierung des vRNA-RT-Komplexes noch vor der eigentlichen reversen Transkription nötig ist. Detaillierte Studien zur Lebenszeit von Transkriptionskomplexen zeigten, dass die RT von der viralen RNA (vRNA) nach Eintritt des Capsids in die Zelle dissoziiert [43]. Der in der Literatur beschriebene stimulatorische Einfluss des NCs auf die Initiation der reversen Transkription [65] und das Überwinden von missgepaarten Substratstrukturen [85] könnte ebenfalls durch den hier vorgestellten Mechanismus erklärt werden.

Der Einfluss des NCs innerhalb der reversen Transkription beschränkt sich nicht auf die Hybridisierungs- und Strangtransferereignisse. Die hier durchgeführten Arbeiten zeigen, dass das NC - vermutlich über eine direkte Interaktion mit der RT - stimulierend auf den Nukleotideinbau einwirkt. Eine Blockade dieser Wechselwirkung könnte möglicherweise zu einer verringerten Transkriptionseffizienz führen, die wiederum den viralen Replikationszyklus verlangsamen könnte. Erste Ansätze, die Interaktion mithilfe von RT-gerichteten monoklonalen Antikörpern zu beeinflussen, zeigten keinen Erfolg. Dennoch bleibt die Modulation des RT-NC-Komplexes ein interessanter Angriffspunkt, um die reverse Transkription zu beeinflussen. Das hier etablierte FRET-System stellt ein einfaches Assay-System dar, um potenzielle Inhibitoren der RT-NC-Wechselwirkung funktionell zu testen. Weiterführende Experimente müssen zeigen, inwieweit diese Blockade die Replikationsfähigkeit des Virus beeinflusst.

5.6 Übergreifende Diskussion der Inhibitionsstrategien

Neben dem Inhibitions Potenzial der einzelnen Molekülklassen müssen für eine klinische Anwendung zahlreiche weitere Anforderungen erfüllt werden. In diesem Abschnitt soll für die jeweilige Molekülklasse ein kurzer Überblick über die Vor- und Nachteile hinsichtlich einer intrazellulären Applikation gegeben werden.

Nukleinsäuren, wie RT1t49 und die Pseudoknoten-RNA, weisen im Allgemeinen eine niedrige Immunogenität auf. Außerdem zeichnen sie sich durch eine hohe Spezifität aus, die eine Beeinträchtigung zellulärer Proteine gering erscheinen lässt. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass keine Kreuzresistenz zu bereits vorhandenen NRTI-Resistenzmutationen zu beobachten ist. Als großer Nachteil dieser Molekülklasse ist die schwierige intrazelluläre Applikation zu sehen.

Die Problematik der Bioverfügbarkeit wirft sich auch bei den Peptiden auf, da diese meist schwer wasserlöslich sind und die Zellmembran nicht eigenständig passieren können. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist die Selektion geeigneter inhibitorischer Moleküle schwierig und beruht eher auf einem Versuch-Irrtum-System. Für das Peptid p7 konnte allerdings gezeigt werden, dass die potenziellen Resistenzmutanten in ihrer enzymatischen Fähigkeit eingeschränkt sind, sodass deren Aufkommen auf den ersten Blick unwahrscheinlich scheint.

Die Eigenschaften der hier charakterisierten MAS-Substanzen weisen diese Moleküle als vielversprechende neue Wirkstoffklasse aus. Die Moleküle erfüllen die Lipinsky-Regeln, sodass davon auszugehen ist, dass eine orale Applikation möglich wäre. Zudem rufen niedermolekulare Moleküle selten eine Immunantwort hervor. Die Affinität und Inhibitionsfähigkeit der Substanzen kann vermutlich über Seitenkettenmodifikationen gesteigert werden, wie es auch für viele andere niedermolekulare Modulatoren gezeigt wurde. Die Entwicklung von Resistenzen im Grenzflächenbereich erscheint unwahrscheinlich, da sterische Änderungen im Tryptophan-Motiv zur reduzierten Aktivität des Enzyms führen. Denkbar wäre außerdem, dass eine Kombination aus verschiedenen MAS-Substanzen die RT-Aktivität multifunktional beeinflusst. MAS 0 reduziert die Dimerisierung und MAS 1 zusätzlich die Polymeraseaktivität. Eine weitere MAS-Substanz wirkt sich negativ auf die RNaseH-Aktivität aus (persönliche Mitteilung F. Horenkamp). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt scheint daher die Weiterentwicklung der MAS-Moleküle der vielversprechendste Ansatz auf dem Weg zu einem effektiven HIV-Medikament zu sein.

6 Zusammenfassung

Die Reverse Transkriptase (RT) des HIV-1 Virus stellt ein attraktives Zielprotein in der HIV-Therapie dar, da eine Hemmung des Enzyms den viralen Replikationszyklus in sehr frühen Stadien unterbricht. Der Einsatz von momentan verfügbaren RT-Inhibitoren in der medikamentösen Behandlung führt jedoch schnell zur Selektion von resistenten Virusstämmen. Die Entwicklung neuartiger antiviraler Strategien bleibt deshalb eine fortdauernde Aufgabe und stand im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Die HIV-1 Reverse Transkriptase ist ein Heterodimer, das aus den Untereinheiten (UE) p66 und p51 besteht und ausschließlich in seiner dimeren Form enzymatisch aktiv ist. Aufgrund der Korrelation zwischen Dimergehalt und Aktivität der RT ist die Interaktion der beiden Untereinheiten ein interessanter Angriffspunkt zur Inhibitorentwicklung. Über Mutationsstudien konnten die Aminosäuren Lysin 331 und Asparagin 363 in der p51 UE identifiziert werden, die einen entscheidenden Beitrag zur Dimerstabilität leisten. Ein Aminosäureaustausch an diesen Positionen führte zu einer stark reduzierten Dimerbildung und infolgedessen zu einer verringerten Polymeraseaktivität. Kristallstrukturanalysen zeigten, dass Lysin 331 und Asparagin 363 wahrscheinlich mit den Tryptophanen (W) an Position 401, 402 und 410 in der p66 UE interagieren. Eine Blockade dieser Wechselwirkung führt voraussichtlich zu einer verminderten Dimerstabilität. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Rahmen des EU-Projektes TRIOH in Zusammenarbeit mit Prof. Massa (Sienna) die chemische Bibliothek ASINEX nach niedermolekularen organischen Molekülen durchmustert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an W401 und W410 binden. Zwei der aus dem Selektionsprozess hervorgegangenen Substanzen, MAS 0 und MAS 1, konnten in dieser Arbeit als Dimerisierungsinhibitoren charakterisiert werden. MAS 0 reduzierte die Dimerbildung um ca. 30 %, MAS 1 um ca. 50 %. Die halbmaximale Inhibition konnte bei etwa 316 μM (MAS 0) bzw. 64 μM (MAS 1) erreicht werden. Zusätzlich reduzierte MAS 0 unter den gewählten Bedingungen die Polymeraseaktivität der RT um ca. 70 %. Der Inhibitionseffekt war hochspezifisch. Die Aktivität der HIV-1 und HIV-2 RT war reduziert, jedoch nicht die Aktivität der nahe verwandten EIAV RT. In dieser Arbeit konnten somit erstmals niedermolekulare Dimerisierungsinhibitoren für die HIV-1 RT beschrieben werden, die interessante Leitstrukturen für die Medikamentenentwicklung darstellen.

In einem weiteren Ansatz wurde überprüft, ob Nukleinsäuren die Wechselwirkung der

RT Untereinheiten blockieren können. Die untersuchten Nukleinsäuren entstammten einer *in vitro* Selektion, in der die monomere p51 UE als Zielprotein eingesetzt wurde. Der Selektionsprozess sollte zur Anreicherung von Nukleinsäuren führen, die mit den Aminosäuren der Dimerisierungsgrenzflächen interagieren. Die untersuchten Aptamere übten jedoch weder einen Einfluss auf die Dimerisierung noch die enzymatische Aktivität der RT aus. Gleiches galt für verschiedene Peptidfamilien, die von den Grenzflächen der p66 und p51 UE abgeleitet wurden. Die Entwicklung von peptidischen Modulatoren der p66-p51-Interaktion stellte sich in dieser Arbeit daher als schwer umzusetzender Ansatz heraus. Eine Mutation der Aminosäuren 24 und 61, die die Bindung des peptidischen Dimerisierungsinhibitors p7 vermitteln, führte zu einer reduzierten Polymerase- und RNaseH-Aktivität. Eine Resistenzentwicklung gegenüber p7 würde daher die Replikationsfähigkeit derartiger Viren beeinträchtigen.

In dieser Arbeit wurden darüber hinaus Inhibitionsexperimente mit klinisch relevanten RT-Mutanten, die eine Resistenz gegenüber nukleosidischen Inhibitoren (NRTI) wie AZT aufweisen, durchgeführt. Das DNA-Aptamer RT1t49 und die Pseudoknoten-RNA reduzierten mit einem IC_{50} im unteren nanomolaren Bereich effektiv sowohl die enzymatischen Aktivitäten des RT-Wildtyps als auch die Aktivitäten von NRTI-resistenten RT-Mutanten. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass RT1t49 eine zehnfach bessere Affinität (K_d von 123 pM) zur RT als bisher angenommen aufweist. Nukleinsäuren, die wie die RT1t49 und die Pseudoknoten-RNA die Bindungsfurche der RT besetzen und dadurch das natürliche Substrat verdrängen, kommen somit als potente antivirale Wirkstoffklasse in der Behandlung von NRTI-resistenten HIV-Stämmen in Frage.

Ein weiterer Ansatz umfasste mechanistische Untersuchungen zum Einfluss des viralen Nucleocapsid-Proteins auf die Polymeraseaktivität der RT. Über Nukleotideinbaustudien konnte nachgewiesen werden, dass das NC bei einem molaren Verhältnis von NC zu Nukleotid im verwendeten Substrat von 1:1–2:1 den Nukleotideinbau stimuliert. Zeitaufgelöste fluoreszenzspektroskopische Messungen zeigten, dass dieser Effekt auf eine NC-vermittelte, reduzierte Dissoziationsgeschwindigkeit der RT-Nukleinsäure-Komplexe zurückzuführen ist. Für den Prozess der reversen Transkription innerhalb der Zelle ist daher anzunehmen, dass durch die NC-vermittelte Stabilisierung des binären Komplexes im Nukleoproteinkomplex eine höhere Prozessivität an stabilen Sekundärstrukturelemente erreicht werden kann. Diese mechanistischen Untersuchungen zeigen eine weitere und neuartige Möglichkeit der Inhibition auf: die Blockade der NC-RT-Interaktion, die vermutlich eine ineffiziente reverse Transkription zur Folge hätte. Die in dieser Arbeit entwickelte fluoreszenzspektroskopische Methode zur Bestimmung der RT-Substrat-Dissoziation stellt ein einfaches Assay-System dar, um potenzielle Inhibitoren der RT-NC-Wechselwirkung funktionell zu testen.

A Abkürzungen und Definitionen

A.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AIDS	erworbenes Immunschwäche-Syndrom des Menschen
Amp	Ampicillin
AMV	aviäres Myoblastosisvirus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Azidothymidin (Zidovudin)
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Cytosin
Ci	Curie (Maßeinheit der Radioaktivität)
cpm	<i>counts per minute</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
Cy5	Cyanin 5
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddC	Didesoxycytidin
ddI	Didesoxyinosin
DMSO	Dimethylsulfonoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
ds DNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIAV	Virus der infektiösen Anämie der Pferde

A Abkürzungen und Definitionen

Env	<i>env</i> -Genprodukt, envelope
Em	Emission
Ex	Excitation
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
G	Guanosin
Gag	<i>gag</i> -Genprodukt, gruppenspezifische Antigene
h	Stunde(n)
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IN	virale Integrase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KF	Klenow-Fragment
LB-Medium	Luria-Bertoni-Medium
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	mol/l
min	Minute(n)
mRNA	Boten-/messenger-RNA
nt	Nukleotid(e)
NA	Nukleinsäure
NC	Nucleocapsid
NRTI	nukleosidischer Inhibitor der Reversen Transkriptase
NNRTI	nicht nukleosidischer Inhibitor der Reversen Transkriptase
NTP	Ribonukleotidtriphosphate
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pbs	<i>primer binding site</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	<i>pol</i> -Genprodukt, Polymerase
ppt	<i>polypurine tract</i>
PR	virale Protease
p/t	Primer/Template-Hybrid
QF	<i>Quench-Flow</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseH	Ribonuklease H

rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Uracil
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
Virion	infektiöses Viruspartikel
v/v	Volumen pro Volumen
vRNA	virale RNA
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

A.2 Definitionen

IC_{50}	Konzentration eines Inhibitors, bei der 50 % der gemessenen Reaktion gehemmt wird
K_d	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
k_{diss}	Dissoziationsratenkonstante
k_{pol}	Nukleotideinbaurate
<i>pre-steady state</i>	Anfangsphase einer enzymkatalysierten Reaktion, in der sich der Enzym-Substrat-Komplex aufbaut
Primer	Oligonukleotid, das mit einer komplementären Nukleinsäurematrize einen Doppelstrang bildet und an dessen 3'OH-Ende die Nukleinsäuresynthese beginnt
<i>single turnover</i>	Reaktion, mit nur einer Substrat-Umsetzung am Enzym
<i>steady state</i>	Reaktion, die sich im Fließgleichgewicht befindet
Template	Nukleinsäure-Matrize, deren Gegenstrang von der Polymerase synthetisiert wird

B Theoretische Grundlagen der Kinetischen Methoden

B.1 Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Gleichgewichtstitration

Die Gleichgewichtsreaktion zweier Bindungspartner A und B kann folgendermaßen beschrieben werden:



Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_d ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} \quad (\text{B.2})$$

Nach der Massenerhaltung gilt:

$$[A]_0 = [A] + [AB] \quad (\text{B.3})$$

analog für $[B]_0$

$[A]_0, [B]_0$ = Gesamtkonzentration an Bindungspartner A bzw. B

$[A], [B]$ = Konzentration an freiem Bindungspartner A bzw. B

$[AB]$ = Konzentration des Komplexes aus A und B

Aus Massenwirkungsgesetz (Gl. B.2) und Massenerhaltung (Gl. B.3) ergibt sich folgende Beziehung:

$$K_d = \frac{([A]_0 - [AB]) \cdot ([B]_0 - [AB])}{[AB]} \quad (\text{B.4})$$

Die Auflösung der Gleichung nach $[AB]$ liefert zwei Lösungen:

$$[AB] = \frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [A]_0 \cdot [B]_0} \quad (\text{B.5})$$

Eine physikalisch sinnvolle Lösung ist jedoch nur die, mit dem negativen Vorzeichen vor dem Wurzelterm. Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Gleichgewichtstitration ist die Messgröße die Änderung des Fluoreszenzsignals, das von dem Bindungspartner mit konstanter Konzentration ausgeht. Die Änderung ist proportional zum Bindungsgrad, der durch das Verhältnis von $[AB]$ zu $[B]_0$ gegeben ist. Die Proportionalitätskonstante ist dabei die maximale Fluoreszenzänderung ΔF_{\max} , die unter Sättigungsbedingungen zu beobachten ist.

$$\Delta F = \Delta F_{\max} \cdot \frac{[AB]}{[B]_0} \quad (\text{B.6})$$

ΔF = Fluoreszenzänderung während eines Titrationsschritts

ΔF_{\max} = maximale Fluoreszenzänderung

Die in jedem Titrationsschritt gemessene Gesamtfluoreszenz F setzt sich zusammen aus der Grundfluoreszenz F_0 des freien fluoreszierenden Bindungspartners und der Fluoreszenzänderung ΔF durch die Zugabe des zweiten Bindungspartners. Zusammen mit Gleichung B.6 ergibt sich:

$$F = F_0 + (F_{\max} - F_0) \cdot \frac{[AB]}{[B]_0} \quad (\text{B.7})$$

Somit ergibt sich für die Gesamtfluoreszenz folgender Zusammenhang:

$$F = F_0 + (F_{\max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [A]_0 \cdot [B]_0}}{[B]_0} \quad (\text{B.8})$$

F = Fluoreszenzintensität

F_0 = Grundfluoreszenz des vorgelegten Bindungspartners

F_{\max} = maximale Gesamtfluoreszenz

$[A]_0$ = Gesamtkonzentration von A

$[B]_0$ = Gesamtkonzentration von B

Die bei einer Gleichgewichts-Fluoreszenztitration in Abhängigkeit von $[A]_0$ oder $[B]_0$ gemessene Bindungskurve von F kann mit Hilfe der quadratischen Gleichung (Gl. B.8) ausgewertet werden. Dabei wird $[A]_0$ oder $[B]_0$ als Konstante vorgegeben.

B.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Verdrängungstitration

Über Verdrängungstitrationen können Affinitäten von Liganden bestimmt werden, die bei Bindung an einen Bindungspartner kein messbares Signal hervorrufen. Ist die Dissoziationskonstante für einen Liganden bekannt, z.B. für das hier verwendete fluoreszenzmarkierte p/t, kann durch Verdrängung dieses Liganden die Affinität eines um die Bindungsstelle kompetitierenden, zweiten Liganden (z.B. das Aptamer RT1t49) bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms *Scientist*. Für den Fall der kompetitiven Titration kann jedes einzelne Gleichgewicht, das Verhältnis zwischen gesamter und freier Konzentration der Komponenten und die Zugehörigkeit des beobachteten Signals definiert werden. Daraus ergab sich folgendes Modell:

Modell

IndVars: Ctot

DepVars: Af, Bf, AB, AC, Cf, F

Params: Kd1, Kd2, Atot, Btot, Yb, Yab

$AB = Af \cdot Bf / Kd1$

$AC = Af \cdot Cf / Kd2$

$Atot = Af + AB + AC$

$Btot = Bf + AB$

$Ctot = Cf + AC$

$0 < Af < Atot$

$0 < Bf < Btot$

$0 < Cf < Ctot$

$F = Bf \cdot Yb + AB \cdot Yab$

Definitionen

A Enzym

B markiertes p/t

C unmarkierte Nukleinsäure

f freie Konzentration

tot gesamte Konzentration

F Fluoreszenz

Kd1 K_d von B

Kd2 K_d von C

Yb $F_{(Btot, frei)} / [Btot]$

Yab $F_{(AB, komplex)} / [AB]$

Während der Berechnung wurde die bekannte Dissoziationsgleichgewichtskonstante des markierten p/t (Kd1), sowie wahlweise einer oder mehrere der anderen Parameter konstant gehalten.

B.3 Bestimmung der Pre-Steady State Geschwindigkeit des Nukleotideinbaus

Für die Bestimmung der *pre-steady state* Geschwindigkeit des Nukleotideinbaus wurde ein Primer/Template genutzt, dass aufgrund der Templatesequenz nur den Einbau einer Base erlaubt. Mischt man Enzym mit einem Überschuss an Substrat (Nukleotid), beobachtet man zunächst eine Anhäufung (*burst*) von Produkt, dessen Bildungsgeschwindigkeit höher ist als die des *steady state* Umsatzes. Dieser *burst* entsteht durch Anhäufung des Produkts (p+1) am aktiven Zentrum des Enzyms und seine Amplitude entspricht der aktiven Enzymkonzentration, die zu Beginn der Reaktion p/t produktiv gebunden hat $[(RT_{p/t})_0]$. Es folgt eine *steady state* Phase, die abhängig von der Freisetzungsgeschwindigkeit des Produktes (p+1/t) ist. Aufgrund des hohen Substratüberschusses kann eine Rückreaktion kaum erfolgen, sodass die Reaktion als irreversibel angesehen werden kann und einfach exponentiell verläuft. Für die nachfolgende *steady state* Phase wird ein linearer Term ($k_{cat}[(RT_{p/t})_0]t$) eingeführt. Der Verlauf der Produktbildung kann daher durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$[p_{+1}]_t = [(RT_{p/t})_0][1 - (e^{-k_{pol}t})] + k_{cat}[(RT_{p/t})_0]t \quad (\text{B.9})$$

p_{+1}	Primer, der um ein Nukleotid verlängert wurde
$(RT_{p/t})_0$	p/t-Konzentration, die bei t=0 produktiv an RT gebunden ist (<i>burst</i> -Amplitude)
k_{pol}	Produktbildungsgeschwindigkeit in der <i>burst</i> -Phase
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante der <i>steady state</i> Phase
t	Messzeit

Für Reaktionen, deren *burst*-Phase zweifach exponentiell verlief, erweiterte sich Gleichung B.9 um einen exponentiellen Term.

Literaturverzeichnis

- [1] G.K. Amarasinghe, R.N. De Guzman, R.B. Turner, K.J. Chancellor, Z.R. Wu, and M.F. Summers. NMR structure of HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem loop SL2 of the ψ -RNA packaging signal. *Journal of Molecular Biology*, 301:491–511, 2000.
- [2] M.-L. Andreola, F. Pileur, C. Calmels, M. Ventura, L. Tarrago-Litvak, J.-J. Toulmé, and S. Litvak. DNA aptamers selected against the HIV-1 RNase H display *in vitro* antiviral activity. *Biochemistry*, 40:10087–10094, 2001.
- [3] D. Arion, N. Sluis-Cremer, K.-L. Min, M.E. Abram, R.S. Fletcher, and M.A. Parniak. Mutational analysis of Tyr-501 of HIV-1 reverse transcriptase. Effects on ribonuclease H activity and inhibition of this activity by *n*-acylhydrazones. *Journal of Biological Chemistry*, 277:1370–1374, 2002.
- [4] S. Baba, K. Takahashi, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, H. Takaku, R.J. Gorelick, and G. Kawai. Role of the zinc fingers of HIV-1 nucleocapsid protein maturation of genomic RNA. *Journal of Biochemistry*, 134:637–639, 2003.
- [5] C. Bampi, A. Bibillo, M. Wendeler, G. Divita, R.J. Gorelick, S.F.J. Le Grice, and J.-L. Darlix. Nucleotide excision-repair and template-independent addition by HIV reverse transcriptase in the presence of nucleocapsid-protein. *Journal of Biological Chemistry*, 24:11736–11743, 2006.
- [6] C. Bampi, S. Jacquenet, D. Lener, D. Decimo, and J.L. Darlix. The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36:1668–1686, 2004.
- [7] F. Barré-Sinoussi, J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, W. Axler-Rozenbaum, and L. Montagnier. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome AIDS. *Science*, 220:868–871, 1983.
- [8] S.P. Becerra, A. Kumar, M.S. Lewis, S.G. Widen, J. Abbotts, E.M. Karawya, S.H. Hughes, J. Shiloach, S.H. Wilson, and M.S. Lewis. Protein-protein interactions of HIV-1 reverse transcriptase: implication of central and c-terminal regions in subunit binding. *Biochemistry*, 30:11707–11719, 1991.
- [9] H. Beltz, E. Plémont, E. Schaub, D. Ficheux, B. Roques, J.-L. Darlix, and Y. Mély. Role of the structure of the top half of HIV-1 cTAR DNA on the nucleic acid destabilizing activity of the nucleocapsid protein NCp7. *Journal of Molecular Biology*, 338:711–723, 2004.

- [10] T. Berg. Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit niedermolekularen organischen Molekülen. *Angewandte Chemie*, 115:2566–2586, 2003.
- [11] J.A. Berglund, B. Charpentier, and M. Rosbash. High affinity binding site for the HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acid Research*, 25:1042–1049, 1997.
- [12] R. Berkowitz, J. Fisher, and S.P. Goff. RNA packaging. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 214:177–218, 1996.
- [13] H.C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, 7:1513–1523, 1979.
- [14] A.A. Bogan and K.S. Thorn. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *Journal of Molecular Biology*, 280:1–9, 1998.
- [15] G. Borkow, R.S. Fletcher, J. Barnard, D. Arion, D. Motakis, G.J. Dmitrienko, and M.A. Parniak. Inhibition of the ribonuclease H and DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase by *n*-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphtahaldehyde hydrazone. *Biochemistry*, 36:3179–3185, 1997.
- [16] M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254, 1976.
- [17] V. Briz, E. Poveda, and V. Soriano. HIV entry inhibitors: mechanism of action and resistance pathways. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57:619–627, 2006.
- [18] D.H. Burke, L. Scates, K. Andrews, and L. Gold. Bent pseudoknots and novel RNA inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) reverse transcriptase. *Journal of Molecular Biology*, 264:650–666, 1996.
- [19] A. Carr. Toxicity of antoretroviral therapy and implications for drug delivery. *Nature Reviews in Drug Discovery*, 2:624–634, 2003.
- [20] U. Certa, W. Bannwarth, D. Stuber, R. Gentz, M. Lanzer, S. Le Grice, F. Guillot, I. Wendler, G. Hunsmann, and H. Bujard. Subregions of a conserved part of the HIV gp41 transmembrane protein are differentially recognized by antibodies of infected individuals. *The EMBO Journal*, 5:3051–3056, 1986.
- [21] L. Chaloin, M.J. Lehmann, G. Sczakiel, and T. Restle. Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acid Research*, 30:4001–4008, 2002.
- [22] B. Chan, K. Weidemaier, W.T. Yip, P.F. Barbara, and K. Musier-Forsyth. Intra-tRNA distance measurements for nucleocapsid protein-dependent tRNA unwinding during priming of HIV reverse transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96:459–464, 1999.

-
- [23] J.L. Clever and T.G. Parslow. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *Journal of Virology*, 71:3407–3414, 1997.
- [24] J.H. Condra, M.D. Miller, D.J. Hazuda, and E.A. Emini. Potential new therapies for the treatment of HIV-1 infection. *Annual Reviews in Medicine*, 53:541–555, 2002.
- [25] J. Cramer. *Funktionelle Charakterisierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Hepatitis-C-Virus. Untersuchung molekularer Mechanismen der Substratspezifität von DNA-abhängigen DNA-Polymerasen*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, 2004.
- [26] J. Cramer, M. Strerath, A. Marx, and T. Restle. Exploring the effects of active site constraints on HIV-1 reverse transcriptase on DNAPolymerase fidelity. *Journal of Biological Chemistry*, 277:43593–43598, 2002.
- [27] E. De Clercq. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs: Past, present and future. *Chemistry and Biodiversity*, 1:44–64, 2004.
- [28] R.N. DeGuzman, Z.R. Wu, C.C. Stalling, L. Pappalardo, P.N. Borer, and M.F. Summers. Structure of HIV-1 nucleocapsid protein bound to SL3 ψ -RNA recognition element. *Science*, 279:384–388, 1998.
- [29] J. Depollier, M.L. Hourdou, G. Aldrian-Herrada, P. Rothwell, T. Restle, and G. Divita. Insight into the mechanism of a peptide inhibitor of HIV reverse transcriptase dimerization. *Biochemistry*, 4:1909–1918, 2005.
- [30] J.J. DeStefano and J.V. Christofaro. Selection of primer-template sequences that bind human immunodeficiency virus reverse transcriptase with high affinity. *Nucleic Acids Research*, 34:130–139, 2006.
- [31] F. Di Marzo Veronese, T.D. Copeland, A.L. De Vico, R. Rahman, S. Oroszlan, R.C. Gallo, and M.G. Sarngadharan. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLVIII/LAV. *Science*, 231:1289–1291, 1986.
- [32] J. Ding, S.H. Hughes, and E. Arnold. Protein-nucleic acid interactions and DNA conformation in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer. *Biopolymers*, 44:125–138, 1997.
- [33] G. Divita, B. Müller, U. Immendörfer, M. Gautel, K. Rittinger, T. Restle, and R.S. Goody. Kinetics of interaction of HIV-1 reverse transcriptase with primer/template. *Biochemistry*, 32:7966–7971, 1997.
- [34] G. Divita, T. Restle, and R. S. Goody. Characterization of the dimerization process of HIV-1 reverse transcriptase heterodimer using intrinsic protein fluorescence. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 342:153–158, 1993.

- [35] G. Divita, T. Restle, R.S. Goody, J.C. Chermann, and J.G. Baillon. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimerization using synthetic peptides derived from the connection domain. *Journal of Biological Chemistry*, 269:13080–13083, 1994.
- [36] G. Divita, K. Rittinger, C. Geourjon, G. Deleage, and R.S. Goody. Dimerization kinetics of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase: a two step process. *Journal of Molecular Biology*, 245:508–521, 1995.
- [37] G. Divita, K. Rittinger, T. Restle, U. Immendorfer, and R.S. Goody. Conformational stability of dimeric HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases. *Biochemistry*, 34:16337–16346, 1995.
- [38] S. Druillenec, A. Caneparo, H. de Rocquigny, and B.P. Roques. Evidence of interaction between the nucleocapsid protein NCp7 and the reverse transcriptase of HIV-1. *Journal of Biological Chemistry*, 274:11283–11288, 1999.
- [39] J.E. Drummond, L.E. Hounds, R.J. Gorelick, J.R. Casas-Finet, W.J. Bosche, L.E. Henderson, D.J. Waters, and L.O. Arthur. Wildtype and mutant HIV 1 nucleocapsid proteins increase the proportion of long cDNA transcripts by viral transcriptase. *AIDS Research and Human Retrovirology*, 13:533–543, 1997.
- [40] E. Dufour, J. Reinbolt, M. Castroviejo, B. Ehresmann, S. Litvak, L. Tarrago-Litvak, and M.-L. Andreola. Cross-linking localization of a HIV-1 reverse transcriptase peptide involved in the binding of the primer tRNA^{Lys3}. *Journal of Molecular Biology*, 285:1339–1346, 1999.
- [41] B. Ehresmann, P. Imbault, and J.H. Weil. Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNAs and rRNAs. *Analytical Biochemistry*, 54:454–463, 1973.
- [42] C. Ezzell. AIDS drug gets green light. *Nature*, 329:751, 1987.
- [43] A. Fassati and S.P. Goff. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 75:3626–3635, 2001.
- [44] Y.X. Feng, S. Campbell, D. Harvin, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and A. Rein. The human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein has nucleic acid chaperone activity: Possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. *Journal of Virology*, 73:459–464, 1999.
- [45] A.L. Ferris, A. Hizi, S.D. Showalter, S. Pichuanes, L. Babe, C.S. Craik, and H.S. Hughes. Immunological and proteolytic analysis of HIV-1 reverse-transcriptase structure. *Virology*, 175:456–464, 1990.
- [46] R.J. Fisher, A. Rein, M. Fivash, M.A. Urbaneja, J.R. Casas-Finet, M. Medaglia, and L.E. Henderson. Sequence-specific binding of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein to short oligonucleotides. *Journal of Virology*, 72:1902–1909, 1998.

- [47] T.S. Fisher, T. Darden, and V.R. Prasad. Substitution at Phe 61 in the $\beta 3$ – $\beta 4$ hairpin of HIV-1 reverse transcriptase reveal a role for the fingers subdomain in strand displacement. *Journal of Molecular Biology*, 325:443–459, 2003.
- [48] T.S. Fisher, P. Joshi, and V.R. Prasad. Mutations that confer resistance to template-analog inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase lead to severe defects in HIV replication. *Journal of Virology*, 76:4068–4072, 2002.
- [49] T.S. Fisher, P. Joshi, and V.R. Prasad. HIV-1 reverse transcriptase mutations that confer decreased in vitro susceptibility to anti-RT DNA aptamer RT1t49 confer cross-resistance to other anti-RT aptamers but not to standard RT inhibitors. *AIDS Research and Therapy*, 2:1–10, 2005.
- [50] C. Fournier, J.-C. Cortay, C. Carbonnelle, C. Ehresmann, R. Marquet, and P. Boulanger. The HIV-1 Nef protein enhances the affinity of reverse transcriptase for RNA *in vitro*. *Virus Genes*, 25:255–269, 2002.
- [51] A.D. Frankel and J.A.T. Young. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. *Annual Reviews in Biochemistry*, 67:1–25, 1998.
- [52] E.O. Freed. HIV-1 replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 26:13–33, 2001.
- [53] J.E. Gallant. Strategies for long-term success in the treatment of HIV infection. *Journal of the American Medical Association*, 283:1329–1334, 2000.
- [54] R. Gallo, S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kaplan, B.F. Haynes, T.J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, and P.D. Markham. Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus HTLV-III from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 224:500–503, 1984.
- [55] M. Götte, S. Fackler, T. Hermann, E. Perola, L. Cellai, H.J. Gross, S.F. Le Grice, and H. Heumann. HIV-1 RT-associated RNase H cleaves RNA:RNA in arrested complexes: implications for the mechanism by which RNase H discriminates between RNA:RNA and RNA:DNA. *The EMBO Journal*, 14:833–841, 1995.
- [56] M. Götte, X. Li, and M.A. Wainberg. HIV-1 reverse transcription: A brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365:199–210, 1999.
- [57] R.M. Gulick. New antiretroviral drugs. *Clinical Microbiology and Infection*, 9:186–193, 2003.
- [58] J. Guo, J. Tiyun, W.U. and Bess, L.E. Henderson, and J.E. Levin. Actinomycin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 minus-strand transfer in in vitro and endogenous reverse transcriptase assays. *Journal of Virology*, 72:6716–6724, 1998.
- [59] B.H. Hahn, M.A. Gonda, G.M. Shaw, M. Popovic, J.A. Hoxie, R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome HTLV-III: different viruses exhibit greatest diversity in their envelope genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 82:4813–4817, 1985.

- [60] R.N. Hannoush, K.-L. Min, and M.J. Damha. Diversity-oriented solid-phase synthesis and biological evaluation of oligonucleotide hairpins as HIV-1 RNaseH inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 32:6164–6175, 2004.
- [61] D.M. Held, J.D. Kissel, J.T. Patterson, D.G. Nickens, and D.H. Burke. HIV-1 inactivation by nucleic acid aptamers. *Frontiers in Bioscience*, 11:89–112, 2006.
- [62] W.S. Hu and H.M. Temin. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science*, 250:1227–1233, 1990.
- [63] H. Huang, R. Chopra, G.L. Verdine, and S.C. Harrison. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 RT: implications for drug resistance. *Science*, 282:1669–1675, 1998.
- [64] S.H. Hughes. Molecular matchmaking: NNRTIs can enhance the dimerization of HIV type 1 reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98:6991–6992, 2001.
- [65] Y. Iwatani, A.E. Rosen, J. Guo, and K. Musier-Forsyth. Efficient initiation of HIV-1 reverse transcription *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 278:14185–14195, 2003.
- [66] A. Jacobo-Molina, J. Ding, R.G. Nanni, A.D. Jr Clark, X. Lu, C. Tantillo, R.L. Williams, G. Kamer, A.L. Ferris, P. Clark, A. Hizi, S.H. Hughes, and E. Arnold. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90:6320–6324, 1993.
- [67] J. Jaeger, T. Restle, and T.A. Steitz. The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an RNA pseudoknot inhibitor. *The EMBO Journal*, 17:4535–4542, 1998.
- [68] X. Ji, G.J. Klarmann, and B.D. Preston. Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein on HIV-1 reverse transcriptase activity *in vitro*. *Biochemistry*, 35:132–143, 1996.
- [69] K.A. Johnson. Transient state kinetic analysis of enzyme reaction pathways. *Enzymes*, 20:1–61, 1992.
- [70] P.E. Johnson, R.B. Turner, Z.R. Wu, L. Hairston, J. Guo, J.G. Levin, and M.F. Summers. A mechanism for plus-strand transfer enhancement by the HIV-1 nucleocapsid protein during reverse transcription. *Biochemistry*, 39:9084–9091, 2000.
- [71] H. Jonckheere, J. Anné, and E. De Clercq. The HIV-1 reverse transcription RT process as target for RT inhibitors. *Medical Research Reviews*, 20:129–154, 2000.
- [72] P. Joshi and V.R. Prasad. Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by template analog reverse transcriptase inhibitors derived by SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment). *Journal of Virology*, 76:6545–6557, 2002.
- [73] C.M. Joyce and S.J. Benkovic. DNA polymerases fidelity: Kinetics, structure and checkpoints. *Biochemistry*, 43:14317–14324, 2004.

-
- [74] I. Kanevsky, F. Chaminade, D. Ficheux, Moumen. A., R. Gorelick, Negroni. M., J.-L. Darlix, and P. Fossé. Specific interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and the TAR element. *Journal of Molecular Biology*, 348:1059–1077, 2005.
- [75] R.L. Karpel, L.E. Henderson, and S. Oroszlan. Interaction of retroviral structural proteins with single-stranded nucleic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 262:4961–4967, 1987.
- [76] O. Kensch, B.A. Connolly, H.J. Steinhoff, A. McGregor, R.S. Goody, and T. Restle. HIV-1 reverse transcriptase-pseudoknot RNA aptamer interaction has a binding affinity in the low picomolar range coupled with high specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 275:18271–18278, 2000.
- [77] R. Khan and D.P. Giedroc. Nucleic acid binding properties of recombinant Zn^{2+} HIV-1 nucleocapsid protein are modulated by COOH-terminal processing. *Journal of Biological Chemistry*, 269:22538–22546, 1994.
- [78] J.M. Kilby, M.B. Marques, D.L. Jaye, P.B. Tabereaux, V.B. Reddy, and K.B. Waites. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Medicine*, 4:1302–1307, 1998.
- [79] B.I. Klasens, H.T. Huthoff, A.T. Das, R.E. Jeeninga, and B. Berkhout. The effect of template RNA structure on elongation by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1444:355–370, 1999.
- [80] L.A. Kohlstaedt, J. Wang, J.M. Friedman, P.A. Rice, and T.A. Steitz. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with inhibitor. *Science*, 256:1783–1790, 1992.
- [81] R. Krebs. *Mechanistische Untersuchungen zur Polymerasefunktion der Reversen Transkriptase von HIV-1 und von klinisch relevanten Resistenzmutanten*. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg, 1997.
- [82] R. Krebs, U. Immendörfer, S. Thrall, B.M. Wöhrle, and R.S. Goody. Single-step kinetics of HIV-reverse transcriptase mutants responsible for virus resistance to nucleoside inhibitors zidovudine and 3TC. *Biochemistry*, 36:10292–10300, 1997.
- [83] G. Krishnamoorthy, B. Roques, J.-L. Darlix, and Y. Mély. DNA condensation by the nucleocapsid protein from the HIV-1: A mechanism ensuring DNA protection. *Nucleic Acid Research*, 31:5425–5432, 2003.
- [84] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [85] M. Lapadat-Tapolksy, C. Gabus, M. Rau, and J.-L. Darlix. Possible role of HIV-1 nucleocapsid protein in the specificity of proviral DNA synthesis and in its variability. *Journal of Molecular Biology*, 268:250–260, 1997.

- [86] M. Lapadat-Tapolsky, C. Pernelle, C. Borie, and J.-L. Darlix. Analysis of the nucleic acid annealing activities of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Nucleic Acid Research*, 23:2434–2441, 1995.
- [87] B.A. Larder, D.J.M. Purifoy, K.L. Powell, and G. Darby. Site-specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase. *Nature*, 327:716–717, 1987.
- [88] W. Lee, R.N. DeGuzman, B.G. Turner, N. Tjandra, and M.F. Summers. Dynamical behavior of the HIV-1 nucleocapsid protein. *Journal of Molecular Biology*, 279:633–649, 1998.
- [89] J.G. Levin, J. Guo, I. Rouzina, and K. Musier-Forsyth. Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: Critical role in reverse transcription and molecular mechanism. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 80:217–286, 2005.
- [90] J.A. Levy, A.D. Hoffmann, S.M. Kramer, J.A. Landis, and L.S. Shimabukuro, J.M. and Oshiro. Recovery of AIDS-associated retrovirus from patients with AIDS or AIDS-related conditions and from clinically healthy individuals. *Journal of Infectious Diseases*, 152:734–738, 1984.
- [91] X. Li, Y. Quan, E.J. Arts, Z. Li, B.D. Preston, H. de Rocquigny, B.P. Rocques, J.-L. Darlix, L. Kleiman, M.A. Parniak, and M.A. Weinberg. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein (NCp7) directs specific initiation of minus-strand DNA synthesis primed by human tRNA³_{Lys} *in vitro*: Studies of viral RNA molecules mutated in regions that flank the primer binding site. *Journal of Virology*, 70:4996–5004, 1996.
- [92] M.M. Lightfoote, J.E. Coligan, T.M. Folks, A.S. Faucy, M.A. Martin, and S. Vekantesan. Structural characterization of reverse-transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired-immunodeficiency-syndrome retrovirus. *Journal of Virology*, 60:771–775, 1986.
- [93] C.A. Lipinski. Drug-like properties and the cause of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacology and Toxicology Methods*, 44:235–249, 2000.
- [94] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, and P.J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23:3–25, 1997.
- [95] L. Lo Conte, C. Chothia, and J. Janin. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of Molecular Biology*, 285:2177–2198, 1999.
- [96] L.M. Mansky and H.M. Temin. Lower *in vivo* mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *Journal of Virology*, 69:5087–5094, 1995.
- [97] Morris MC, Robert-Hebmann V, Chaloin L, Mery J, Heitz F, Devaux C, Goody RS, and Divita J. A new potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 274:24941–24946, 1999.

-
- [98] L. Menéndez-Arias. Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends in Pharmacology Science*, 23:381–388, 2002.
- [99] M.D. Miller and D.J. Hazuda. New antiretroviral agents: looking beyond protease and reverse transcriptase. *Current Opinion in Antimicrobials*, 4:535–539, 2001.
- [100] S. Modrow, D. Falke, and U. Truyen. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademische Verlag, Heidelberg, 2003.
- [101] M.C. Morris, C. Berducou, J. Mery, F. Heitz, and G. Divita. The thumb domain of the p51-subunit is essential for activation of HIV reverse transcriptase. *Biochemistry*, 38:15097–15103, 1999.
- [102] A. Mulky, S.G. Sarafanos, Y. Jia, E. Arnold, and J.C. Kappes. Identification of amino acid residues in the human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase tryptophan-repeat motif that are required for subunit interaction using infectious virions. *Journal of Molecular Biology*, 349:673–684, 2005.
- [103] B. Müller, T. Restle, S. Weiss, M. Gautel, M. Sczakiel, and R.S. Goody. Co-expression of the subunits of the heterodimer of HIV-1 reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 264:13975–13978, 1989.
- [104] D. Muriaux, H. De Rocquigny, B.P. Roques, and J. Paoletti. NCp7 activates HIV-1 Lai RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 271:33686–33692, 1996.
- [105] R.E. Muthuswami, J. Chen, B.B. Burnett, R.L. Thimmig, N. Janjic, , and C.S. McHenry. The HIV-1 plus-strand transfer reaction: Determination of replication-competent intermediates and identification of a novel lentiviral element, the primer over-extension sequence. *Journal of Molecular Biology*, 315:311–323, 2002.
- [106] R.G. Nanni, J. Ding, A. Jacobo-Molina, S.H. Hughes, and E. Arnold. Review of HIV-1 reverse transcriptase three-dimensional structure: Implications for drug design. *Perspectives in Drug Discovery Research*, 1:129–150, 1993.
- [107] A.S. Omrani and D. Pillay. Multi-durg resistant HIV. *Journal of Infection*, 41:5–11, 2000.
- [108] J.A. Peliska, S. Balasubramanian, D.P. Giedroc, and S.J. Benkovic. Recombinant HIV-1 nucleocapsid protein accelerates HIV-1 reverse transcriptase catalyzed DNA strand transfer reactions and modulates RNase H activity. *Biochemistry*, 33:13817–13823, 1994.
- [109] R.J. Pomerantz and D.L. Horn. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nature Medicine*, 9:867–873, 2003.
- [110] G. Proimos. Platelet aggregation inhibition with glycoprotein IIb-IIIa inhibitors. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 11:99–110, 2001.

- [111] L. Ratner, W. Haseltine, R. Patarca, K.J. Livak, B. Starcich, S.F. Josephs, E.R. Doran, J.A. Rafalski, E.A. Whitehorn, and K. Baumeister. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*, 313:277–284, 1985.
- [112] A. Rein. Retroviral packaging: a review. *Archives of Virology*, 9:513–522, 1994.
- [113] A. Rein, L.E. Henderson, and J.G. Levin. Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends in Biochemical Sciences*, 23:297–301, 1998.
- [114] A. Rein, D.E. Ott, J. Mirro, L.O. Arthur, W. Rice, and L.E. Henderson. Inactivation of murine leukemia virus by compounds that react with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, 70:4966–4972, 1996.
- [115] J. Ren, R. Esnouf, E. Garman, D. Somers, C. Ross, C. Kirby, J. Keeling, G. Darby, Y. Jones, and D. Stuart. High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nature Structural Biology*, 2:293–302, 1995.
- [116] T. Restle. *Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Reversen Transkriptase des menschlichen Immundefizienz Virus*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 1991.
- [117] T. Restle, B. Müller, and R.S. Goody. Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. A target for chemotherapeutic intervention. *Journal of Biological Chemistry*, 265:8986–8988, 1990.
- [118] T. Restle, B. Müller, and R.S. Goody. RNase-H activity of HIV reverse transcriptases is confined exclusively to the dimeric forms. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 300:97–100, 1992.
- [119] T. Restle, M. Pawlita, G. Sczakiel, B. Müller, and R.S. Goody. Structure-function relationships of HIV-1 reverse transcriptase determined using monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 267:14654–14661, 1992.
- [120] D.V. Rial and E.A. Ceccarelli. Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications. *Protein Expression and Purification*, 25:503–507, 2002.
- [121] W.G. Rice, J.G. Supko, L. Malspeis, R.W. Buckheit, D. Clanton, M. Bu, L. Graham, C.A. Schaeffer, J.A. Turpin, J. Domagala, R. Gogliotti, J.P. Bader, S.M. Halliday, L. Coren, R.C. Sowder, L.O. Arthur, and L.E. Henderson. Inhibitors of HIV nucleocapsid protein zinc fingers as candidates for the treatment of AIDS. *Science*, 270:1194–1197, 1995.
- [122] D.D. Richman. HIV chemotherapy. *Nature*, 410:995–1001, 2001.
- [123] K. Rittinger, G. Divita, and R.S. Goody. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92:8046–8049, 1995.

-
- [124] D. W. Rodgers, S. J. Gamblin, B. A. Harris, S. Ray, J. S. Culp, B. Hellmig, D. J. Woolf, C. Debouck, and S. C. Harrison. The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92:1222–1226, 1995.
- [125] L. Rodriguez-Rodriguez, Z. Tsuchihashi, G.M. Fuentes, R.A. Bambara, and P.J. Fay. Influence of human immunodeficiency virus nucleocapsid protein on synthesis and strand transfer by the reverse transcriptase *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 270:15005–15011, 1995.
- [126] J.J. Rossi. RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques*, pages 25–29, 2006.
- [127] P. Rothwell. *Structural investigation on HIV-1 RT using single pair fluorescence resonance energy transfer*. Dissertation, Universität Dortmund, Dortmund, 2002.
- [128] P.J. Rothwell, S. Berger, O. Kensch, S. Felekyan, M. Antonik, B.M. Wöhrle, T. Restle, R.S. Goody, and C.A. Seidel. Multiparameter single-molecule fluorescence spectroscopy reveals heterogeneity of HIV-1 reverse transcriptase:primer/template complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100:1655–1660, 2003.
- [129] P.J. Rothwell and G. Waksman. Structure and mechanism of DNA polymerases. *Advances in Protein Chemistry*, 71:401–440, 2005.
- [130] R.S. Russell, C. Liang, and M.A. Wainberg. Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology*, 1:23, 2004.
- [131] J. Sambrook and D.W. Russel. *Molecular cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, third edition, 2001.
- [132] S.G. Sarafianos, K. Das, A.D. Clark, J. Ding, P.L. Boyer, S.H. Hughes, and E. Arnold. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with β -branched amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96:10027–10032, 1999.
- [133] S.G. Sarafianos, K. Das, S.H. Hughes, and E. Arnold. Taking aim at a moving target: designing drugs to inhibit drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase. *Current Opinion in Structural Biology*, 14:716–730, 2004.
- [134] S.G. Sarafianos, K. Das, C. Tantillo, A.D. Jr Clark, J. Ding, J.M. Whitcomb, P.L. Boyer, S.H. Hughes, and E. Arnold. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *The EMBO Journal*, 20:1449–1461, 2001.
- [135] O. Schatz, J. Mous, and S.F.J. Le Grice. HIV-1 RT-associated ribonuclease H displays both endonuclease and 3'-5' exonuclease activity. *The EMBO Journal*, 9:1171–1176, 1990.
- [136] D.J. Schneider, J. Feigon, Z. Hostomsky, and L. Gold. High-affinity ssDNA inhibitors of the reverse transcriptase of type 1 human immunodeficiency virus. *Biochemistry*, 34:9599–9610, 1995.

- [137] A.M. Sheehy, N.C. Gaddis, J.D. Choi, and M.H. Malim. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral vif protein. *Nature*, 418:646–650, 2002.
- [138] M.F. Shubsda, A.C. Paoletti, B.S. Hudson, and P.N. Borer. Affinities of packaging domain loops in HIV-1 RNA for the nucleocapsid protein. *Biochemistry*, 43:7687–7697, 2000.
- [139] N. Sluis-Cremer, D. Arion, M.E. Abram, and M.A. Parniak. Proteolytic processing of an HIV-1 pol polyprotein precursor: insights into the mechanism of reverse transcriptase p66/p51 heterodimer formation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36:1836–1847, 2004.
- [140] N. Sluis-Cremer, D. Arion, and M.A. Parniak. Destabilization of the HIV-1 reverse transcriptase dimer upon interaction with n-acyl hydrazone inhibitors. *Molecular Pharmacology*, 62:398–405, 2002.
- [141] N. Sluis-Cremer and G. Tachedjian. Modulation of the oligomeric structures of HIV-1 retroviral enzymes by synthetic peptides and small molecules. *European Journal of Biochemistry*, 269:5103–5111, 2002.
- [142] A. Somasunderam, M.R. Ferguson, D.R. Rojo, V. Thiviyanathan, X. Li, W.A. O’Brien, and D.G. Gorenstein. Combinatorial selection, inhibition, and antiviral activity of DNA thioaptamers targeting the RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, 44:10388–10395, 2005.
- [143] M. Souquet, T. Restle, R. Krebs, S.F.J. Le Grice, R.S. Goody, and B.M. Wöhrle. Analysis of the polymerization kinetics of homodimeric EIAVp51/p51 reverse transcriptase implies the formation of a polymerase active site identical to the heterodimeric EIAV p66/p51 reverse transcriptase. *Biochemistry*, 37:12144–12152, 1998.
- [144] M. Stevenson. HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*, 9:853–860, 2003.
- [145] D.S. Strayer, R. Akkina, B.A. Bunnell, B. Dropulic, V. Planelles, R.J. Pomerantz, J.J. Rossi, and J.A. Zaia. Current status of gene therapy strategies to treat HIV/AIDS. *Molecular Therapy*, 11:823–842, 2004.
- [146] M.F. Summers, T.L. South, B. Kim, and D.R. Hare. High-resolution structure of an HIV-1 zinc fingerlike domain *via* a new NMR-based distance geometry approach. *Biochemistry*, 29:329–340, 1990.
- [147] Z. Suo and K.A. Johnson. DNA secondary structure effects on DNA synthesis catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Biological Chemistry*, 273:27259–27267, 1998.
- [148] G. Tachedjian, H.E. Aronson, M. de los Santos, J. Seehra, J.M. McCoy, and S.P. Goff. Role of residues in the tryptophan repeat motif for HIV-1 reverse transcriptase dimerization. *Journal of Molecular Biology*, 326:381–396, 2003.

- [149] S.H. Thrall, R. Krebs, L. Wöhrl, B.M. amd Cellai, R.S. Goody, and R. Restle. Pre-steady kinetic characterization of RNA-primed initiation of transcription by HIV-1 reverse transcriptase and analysis of the transition to a processive DNA-primed polymerization mode. *Biochemistry*, 37:13349–13358, 1998.
- [150] C. Tuerk and L. Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249:505–510, 1990.
- [151] C. Tuerk, S. MacDougall, and L. Gold. RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89:6988–6992, 1992.
- [152] B.G. Turner and M.F. Summers. Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*, 285:1–32, 1999.
- [153] M.A. Urbaneja, B.P. Kane, D.G. Johnson, R.J. Gorelick, L.E. Henderson, and J.R. Casas-Finet. Binding properties of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 to a model RNA: Elucidation of the structural determinants for function. *Journal of Molecular Biology*, 287:59–75, 1999.
- [154] J.P. Vacca, B.D. Dorsey, W.A. Schleif, R.B. Levin, S.L. McDaniel, P.L. Darke, J. Zugay, J.C. Quintero, O.M. Blahy, E. Roth, V.V. Sardana, A.J. Schlabach, P.I. Graham, J.H. Condra, L. Gotlib, M.kK. Holloway, I. Lin, J. Chen, K. Vastag, D. Ostovic, P.S. Anderson, E.A. Emini, and J.R. Huff. L-735,524: An orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91:4096–4100, 1994.
- [155] S. Veldhoen and T. Restle. *Recent developments in peptide-based cellular delivery of nucleic acids.*, volume 2. Transworld Research Network, 2006.
- [156] J. Wang, S.J. Smerdon, J. Jäger, L.A. Kohlstaedt, P.A. Rice, J.M. Friedman, and T.A. Steitz. Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91:7242–7246, 1994.
- [157] J. Wapling, K.L. Moore, S. Sonza, J. Mak, and G. Tachedjian. Mutations that abrogate human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimerization affect maturation of the reverse transcriptase heterodimer. *Journal of Virology*, 79:10247–10257, 2005.
- [158] B. M. Wöhrl, R. Krebs, R.S. Goody, and T. Restle. Refined model for primer/template binding by HIV-1 reverse transcriptase: Pre-steady-state kinetic analysis of primer/template binding and nucleotide incorporation events distinguish between different binding modes depending on the nature of the nucleic acids substrate. *Journal of Molecular Biology*, 292:333–344, 1999.
- [159] B.M. Wöhrl, R. Krebs, S. Thrall, S.H. Le Grice, S.F.J. Scheidig, and R.S. Goody. Kinetik analysis of four HIV-1 reverse transcriptase enzymes mutated in the primer grip region of p66. *Journal of Biological Chemistry*, 272:17581–17587, 1997.

- [160] B.M. Wöhrl and K. Moelling. Interaction of HIV-1 RNase H with polypurine tract containing RNA-DNA hybrids. *Biochemistry*, 29:10141–10147, 1990.
- [161] T. Wu, J. Guo, J. Bess, L.E. Henderson, and J.G. Levin. Molecular requirements for human immunodeficiency virus type 1 plus-strand transfer: Analysis in reconstituted and endogenous reverse transcription systems. *Journal of Virology*, 73:4794–4805, 1999.
- [162] W. Wu, L.E. Henderson, T.D. Copeland, R.J. Gorelick, W.J. Bosche, A. Rein, and J.G. Levin. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein reduces reverse transcriptase pausing at a secondary structure near the murine leukemia virus polypurine tract. *Journal of Virology*, 70:7132–7142, 1996.
- [163] L. Zhao and J. Chmielewski. Inhibiting protein-protein interactions using designed molecules. *Current Opinion in Structural Biology*, 15:31–34, 2005.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den