

Struktur-Funktionsbeziehungen und Inhibition  
retroviraler  
Reverser Transkriptasen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Graduiertenschule für Mathematik und  
Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth

vorgelegt von

M. Sc. Biochemikerin und Molekularbiologin

Anna Schneider

Bayreuth 2015



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2011 bis Januar 2015 an der Universität Bayreuth am Lehrstuhl Biopolymere unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Birgitta M. Wöhrl angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 03.02.2015

Zulassung durch das Leitungsgremium: 11.02.2015

Wissenschaftliches Kolloquium: 22.06.2015

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Franz Xaver Schmid

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Birgitta M. Wöhrl

Prof. Dr. Franz Xaver Schmid

Prof. Dr. Matthias Ullmann (Vorsitz)

DP. Dr. Jochen Bodem

1. Gutachterin: Prof. Dr. Birgitta M. Wöhrl

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Ersfeld

3. Gutachter: Prof. Dr. Martin Löchelt



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	III
Summary .....	V
1 Einleitung .....	1
1.1 Historisches, Taxonomie und Epidemiologie der Retroviren .....	1
1.2 Genomaufbau von SFVmac und HIV-1 .....	3
1.3 Der retrovirale Replikationszyklus.....	4
1.4 Die Reverse Transkription .....	6
1.5 Das Enzym Reverse Transkriptase im HIV-1 .....	8
1.6 Die Protease-Reverse Transkriptase des SFVmac .....	10
1.6.1 Die Protease der PR-RT von SFVmac .....	10
1.6.2 Die Polymerasedomäne der SFVmac PR-RT.....	11
1.6.3 Die RNase H-Domäne in der SFVmac PR-RT .....	12
1.7 Die Hochaktive Antiretrovirale Therapie.....	13
1.8 Die Azidothymidinresistenz .....	14
1.8.1 Der Ausbau von AZTMP im HIV-1.....	16
1.8.2 Der Resistenzmechanismus gegen AZT im SFVmac .....	18
1.9 Die Inhibitoren der RNase H.....	19
2 Ziele der Arbeit .....	22
3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse.....	23
3.1 Die Domänenorganisation von SFVmac PR-RT.....	23
3.1.1 Bestimmung der (Sub)-Domänengrenzen in der SFVmac PR-RT.....	23
3.1.2 Substratbindung und enzymatische Aktivität von PR-RT Deletionsvarianten .....	25
3.1.3 NMR-spektroskopische Untersuchungen von PR-RT Deletionsvarianten .....	27
3.1.4 Die Aktivierung der PR bei Deletionsvarianten.....	28
3.1.5 Einflüsse der PR auf die Reverse Transkription.....	28
3.2 Die AZT-Resistenz im Modellprotein SFVmac PR-RT .....	30
3.2.1 Die Varianten von SFVmac PR-RT .....	30
3.2.2 Die katalytische Aktivität und der AZTMP-Ausbau.....	31
3.2.3 Substratbindung und Nukleotideinbau von den PR-RT Varianten .....	32
3.2.4 Einbaugenauigkeit von Nukleotiden und RNase H-Aktivität .....	34
3.2.5 ATP Bindungsstudien mit Hilfe der NMR-Spektroskopie.....	35
3.2.6 Kinetische Parameter des AZTMP-Ausbaus.....	36

---

3.2.7	Die ATP-Bindungsaffinität an der RTshort- <i>mt4</i> .....	37
3.3	Studien zur Inhibition der PFV RNase H mit HIV-1 RNase H Inhibitoren .....	39
3.3.1	Wirkung von HIV-1 Inhibitoren auf die PFV RNase H .....	39
3.3.2	NMR-spektroskopische Studien der RDS1643 Bindung in der PFV RNase H .....	41
3.4	Ausblick .....	44
4	Abkürzungsverzeichnis .....	45
5	Literaturverzeichnis .....	49
6	Publikationsliste .....	63
7	Einzelarbeit A .....	65
8	Einzelarbeit B .....	81
9	Einzelarbeit C .....	87
10	Einzelarbeit D .....	105
11	Danksagung .....	117
12	(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen .....	119

## Zusammenfassung

Das Enzym Reverse Transkriptase (RT) ist für den retroviralen Lebenszyklus von entscheidender Bedeutung. Die RT aus dem Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) ist ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten p66 und p51. Im Gegensatz hierzu besitzen Foamy Viren (FVs) wie das Affen Foamy Virus aus Makaken (*simian foamy virus of macaques*, SFVmac) eine Protease (PR)-Domäne am N-Terminus des reifen monomeren PR-RT Enzyms. Alle retroviralen RTs beinhalten eine N-terminale Polymerase- und eine C-terminale Ribonuklease H (RNase H)-Domäne. Die Polymerasedomäne kann in die Handflächen-, Finger-, Daumen- und Verbindungssubdomäne unterteilt werden. Letztere verbindet die Polymerasedomäne mit der C-terminalen RNase H. Während der Reversen Transkription schreibt die RT die genomische virale RNA in doppelsträngige DNA um. Hierbei katalysiert die Polymerasedomäne die DNA-Synthese und der RNA-Strang im entstehenden RNA/DNA-Hybrid wird von der RNase H geschnitten. Damit sind beide, die RNase H- und Polymeraseaktivität für die retrovirale Vermehrung unerlässlich und stellen wichtige Angriffsziele für die antiretrovirale Therapie dar.

Genauere Kenntnisse über die Grenzen und Funktionen von (Sub)-Domänen in der SFVmac PR-RT sind wichtig für strukturelle und mechanistische Studien mittels der Kernspinresonanz (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR)-Spektroskopie. Deshalb wurde der Einfluss von (Sub)-Domänen-deletionen auf die strukturelle Stabilität und enzymatische Aktivität der SFVmac PR-RT untersucht. Sowohl Deletionen der RNase H-Domäne als auch der Verbindungssubdomäne beeinträchtigten beide, durch eine Abnahme der Substratbindungsaffinität oder strukturellen Stabilität, die katalytische Aktivität der Polymerasedomäne. Außerdem erwies sich die Aminosäureregion 107-143 am N-Terminus der RT ebenfalls als wichtig für die katalytische Aktivität und strukturelle Integrität der Polymerase. Die Aktivierung der viralen Protease (PR) erfolgt durch Bindung der PR-RT an das virale RNA-Motif PARM. PR-RTs bei denen die RNase H-Domäne deletiert war, waren nicht mehr zur PR-Aktivierung in der Lage. Darüber hinaus muss die proteolytische Spaltung von Gag vor der Reversen Transkription abgeschlossen sein.

Azidothymidin (AZT) ist ein nukleosidischer Inhibitor, der die RT-Aktivität von HIV-1 und SFVmac *in vivo* und *in vitro* inhibiert. Die Resistenz gegen AZT basiert in beiden Viren auf einem ATP-vermittelten Ausbaumechanismus von bereits eingebautem AZT-Monophosphat (AZTMP). In der SFVmac PR-RT verleihen die vier Substitutionen K211I, I224T, S345T und E350K maximale Resistenz gegen AZT. Um die Bedeutung der einzelnen Substitutionen für den Resistenzmechanismus aufzuklären, wurden PR-RT-Varianten mit ausgewählten Kombinationen der vier Aminosäureaustausche biophysikalisch und biochemisch untersucht. Der Austausch I224T ist ein Polymorphismus mit keinem Effekt auf die AZT-Resistenz an sich. Die Substitution K211I änderte nicht nur die enzymatischen Eigenschaften der PR-RT, wie die katalytische Aktivität und Einbaugenauigkeit von Nukleotiden, sondern verdoppelte auch die

Ausbaueffizienz in Anwesenheit von S345T und E350K. NMR-spektroskopische Experimente mit einer verkürzten Polymerasedomäne (RTshort), bestehend aus den Subdomänen Finger und Handfläche, zeigten keine ATP-Bindung in der Wildtyp-RTshort. Im Gegensatz hierzu war die RTshort-*mt4*, mit allen vier Resistenzsubstitutionen in der Lage ATP mit einem  $K_D$ -Wert von etwa 7.6 mM zu binden. Dabei ist S345T die wichtigste Substitution für den AZTMP-Ausbau, da sie eine hochaffine Bindungstasche für das ATP, vermutlich infolge einer Reorientierung eines bereits vorhandenen Tryptophanrestes, erzeugt.

Die RNase H-Domäne der HIV-1 RT ist ein neues Angriffsziel antiretroviraler Medikamente. Obwohl zahlreiche RNase H Inhibitoren (RHIs) bereits synthetisiert wurden, existieren nur wenige Studien über die Bindungsstellen dieser Inhibitoren. Deshalb war es unser Ziel, ein neues Modellsystem für Bindungsanalysen von HIV-1 RHIs, mit der RNase H aus dem Prototypischen FV (*prototype foamy virus*, PFV) zu etablieren. Zuerst zeigten wir, dass HIV-1 RHIs einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf die PFV RNase H-Aktivität der gesamten PR-RT ausüben, was auf ähnliche Bindungstaschen in beiden Enzymen schließen lässt. In einem zweiten Schritt führten wir NMR-Titrationsexperimente des  $Mg^{2+}$ -komplexierenden Inhibitors RDS1643 und der isolierten PFV RNase H-Domäne durch. Basierend auf unseren NMR-Ergebnissen wurde eine *in silico* Modellierung durchgeführt, um eine potentielle Bindungsstelle für das RDS1643 in der PFV RNase H zu identifizieren. Die Bindungsregion neben dem aktiven Zentrum erlaubt Wechselwirkungen mit  $Mg^{2+}$  und enthält eine hydrophobe Kavität für den aromatischen Teil des Inhibitors. Aufgrund der hohen Strukturhomologie zwischen den RNase H-Domänen aus HIV-1 und PFV war es möglich eine äquivalente RDS1643-Bindungstasche in der HIV-1 RNase H zu definieren.



## Summary

The enzyme reverse transcriptase (RT) is pivotal for the life cycle of retroviruses. The RT from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a heterodimer with the subunits p66 and p51. In contrast, foamy viruses (FVs) such as the Simian Foamy Virus of macaques (SFVmac) harbor the protease (PR) domain at the N-terminus of the mature monomeric PR-RT enzyme. All retroviral RTs consist of a N-terminal polymerase and a C-terminal ribonuclease H (RNase H) domain. The polymerase domain can be subdivided into the palm, fingers, thumb and connection subdomains. The latter links the polymerase domain to the C-terminal RNase H. During reverse transcription the RT converts genomic viral RNA in double stranded DNA. While DNA synthesis is catalyzed by the polymerase domain, the RNA in the emerging RNA/DNA hybrid is degraded by the RNase H domain. Both RNase H and polymerase activity are indispensable for retroviral replication and represent important targets for antiretroviral therapy.

Precise knowledge on boundaries and functions of the (sub)-domains within the SFVmac PR-RT is important for structural and mechanistic (sub)-domain studies via nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Thus we examined the impact of (sub)-domain truncations on structure stability and catalytic activity of the SFVmac PR-RT. Deletions of the RNase H domain as well as the connection subdomain both impaired the catalytic activity of the polymerase domain, due to a decrease in substrate binding affinity or structural stability. Moreover, the amino acid region 107-143 at the N-terminus of the RT was also important for the catalytic activity and structural integrity of the polymerase. Activation of the viral PR requires binding of the PR-RT to the viral RNA motif PARM. PR-RTs whose RNase H domain was deleted resulted in a complete loss of PR activation. Furthermore proteolytic cleavage of Gag must be completed before reverse transcription.

Azidothymidine (AZT) is a nucleoside inhibitor known to inhibit the RT activity of HIV-1 and SFVmac *in vivo* and *in vitro*. In both viruses the resistance against AZT is based on an ATP mediated excision mechanism of the incorporated AZT-monophosphate (AZTMP). In SFVmac PR-RT the four substitutions K211I, I224T, S345T and E350K confer high AZT-resistance. To elucidate the function of each substitution in the resistance mechanism, PR-RT variants containing selected combinations of the four substitutions were investigated biophysically and biochemically. The exchange I224T is a polymorphism with no effect on AZT resistance *per se*. However, substitution K211I not only altered the enzymatic properties of the PR-RT, i.e. catalytic activity and fidelity, but also doubled the excision efficiency in the presence of S345T and E350K. NMR spectroscopy experiments with a truncated polymerase domain (RTshort), composed of the fingers and palm subdomains revealed no ATP-binding in wild type RTshort. In contrast RTshort-*mt4*, harboring all four resistance substitutions, was able to bind ATP with a  $K_D$ -value of ca. 7.6 mM. Here, S345T was the most important substitution for AZTMP-excision, since it created a

high-affinity binding site for ATP, probably owing to the reorientation of an already existing tryptophan residue.

The RNase H domain of HIV-1 RT is a new target for antiretroviral drugs. Although numerous RNase H inhibitors (RHIs) have been synthesized, only few studies exist on the binding sites of inhibitors. Therefore, we wanted to establish a new model system for the binding analysis of HIV-1 RHIs, using prototype FV (PFV) RNase H. First, we showed that HIV-1 RHIs have a comparable inhibitory effect on the PFV RNase H activity of the full length PR-RT, indicating pocket similarity in the two enzymes. In a second step we performed NMR titration experiments of the  $Mg^{2+}$  chelating inhibitor RDS1643 with the isolated PFV RNase H domain. Based on our NMR results *in silico* docking was used to identify a putative RDS1643 binding site in PFV RNase H. The binding region next to the active site comprises  $Mg^{2+}$  interactions as well as a hydrophobic cavity for the aromatic inhibitor moiety. Due to the high structural similarities between the RNase H domain of PFV and HIV-1 it was possible to define an equivalent RDS1643 binding site in HIV-1 RNase H.

# 1 Einleitung

## 1.1 Historisches, Taxonomie und Epidemiologie der Retroviren

Der Prozess der Reversen Transkription bei Retroviren wurde zum ersten Mal von Howard Temin und David Baltimore beschrieben (Temin, 1964; Baltimore, 1970), wofür sie 1975 mit dem Nobelpreis der Physiologie und Medizin geehrt wurden. Das Bemerkenswerte an der Reversen Transkription ist die Widerlegung eines damals zentralen Dogmas der Molekularbiologie. Dieses besagte, dass der genetische Informationsfluss von Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) in Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) unidirektional und damit nicht umkehrbar ist. Retroviren können aber während ihrer Replikationen diesen Informationsfluss von DNA in RNA umkehren, indem sie mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) ihr einzelsträngiges RNA (*single stranded*, ssRNA) Genom in doppelsträngige DNA (*double stranded*, dsDNA) umschreiben (Temin und Mizutani, 1970). Diesem Prozess der Reversen Transkription verdanken die Retroviren ihren Namen. Die Familie der Retroviren lässt sich in die beiden Unterfamilien Orthoretroviren und Spumaretroviren einteilen, wobei sich die Orthoretroviren ihrerseits aus den sechs Gattungen, der  $\alpha$ - bis  $\varepsilon$ -Retroviren sowie den Lentiviren zusammensetzen (vgl. Tab. 1).

**Tab. 1: Klassifizierung der Familie Retroviren mit Genus und Beispielen wichtiger Vertreter** (abgewandelt nach (Rethwilm, 2005)).

Unterfamilie	Gattung	wichtige Vertreter
Orthoretroviren	$\alpha$ -Retrovirus	Rous-Sarkomvirus ( <i>rous sarcoma virus</i> , RSV)
	$\beta$ -Retrovirus	Maus-Mammatumovirus ( <i>mouse mammary tumor virus</i> , MMTV)
	$\gamma$ -Retrovirus	Moloney Mäuseleukämievirus ( <i>moloney murine leukemia virus</i> , MoMLV) Xenotrophisches Mäuseleukämie verwandtes Virus ( <i>xenotropic murine leukemia virus related virus</i> , XMRV)
	$\delta$ -Retrovirus	Humanes T-Zell-lymphotropes Virus ( <i>human T-cell lymphotropic virus</i> , HTLV)
	$\varepsilon$ -Retrovirus	Zander-Hautsarkomvirus ( <i>walleye dermal sarcoma virus</i> , WDSV)
	Lentivirus	Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 und Typ 2 ( <i>human immunodeficiency virus type 1 and 2</i> , HIV-1 and HIV-2)
Spumaretroviren	Foamyvirus	Prototypes Foamyvirus ( <i>prototype foamy virus</i> , PFV); Affen Foamyvirus aus Makaken ( <i>simian foamy virus of macaques</i> , SFVmac)

Ein bekannter und wichtiger Vertreter der Lentiviren ist das Humane Immundefizienzvirus (HIV). Dieses konnte sich in den letzten Jahrzehnten zu einem pandemischen Krankheitserreger mit über 35 Millionen infizierten Menschen weltweit entwickelt ([www.who.int/hiv/data/en/](http://www.who.int/hiv/data/en/); 20.12.2014). Im Jahre 1981 wurde HIV-1 erstmals aus einem Patienten isoliert, seinen endgültigen Namen HIV erhielt das Virus aber erst später (Gallo *et al.*, 1984; Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Nach einer Infektion mit HIV kann die Krankheit mehrere Jahre asymptomatisch vorliegen. Während dieses Zeitraums schädigt der Virus kontinuierlich das Immunsystem und führt schließlich zum erworbenen Immundefizienzsyndrom (*Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS*). In diesem Zustand können dann opportunistische, unter normalen Umständen harmlose, Infektionen zum Tod führen. Der am besten untersuchte HIV-1 Subtyp B kommt vor allem in Europa, Australien und Nordamerika vor. Allein in Deutschland waren Ende des Jahres 2012 nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts etwa 78 Tausend Menschen mit dem HIV-1 Subtyp B infiziert (Epidemiologisches Bulletin Nr. 47/2012 des Robert-Koch-Instituts).

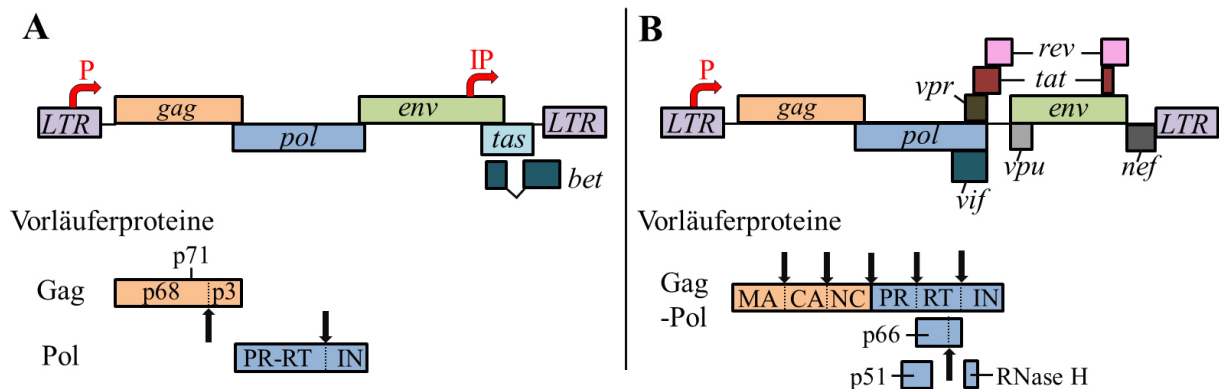
Um HIV, trotz der Ausbildung von Resistenzen gegen Medikamente, auch weiterhin bekämpfen zu können, ist die Entwicklung neuer, wirkungsvoller Substanzen und Behandlungsmethoden ein Hauptziel der antiretroviralen Forschung. Dabei ist insbesondere das Verständnis der Wirkungsweise von Medikamenten sowie der Entstehung von Resistenzen auf molekularer Ebene von grundlegender Bedeutung. Für die Untersuchung dieser molekularen Mechanismen stellen verwandte apathogene Retroviren ohne Krankheitssymptome, wie beispielsweise das Affen Foamyvirus aus Makaken (SFVmac), wichtige Modellorganismen dar.

Die Foamyviren (FVs) bilden eine eigenständige Unterfamilie der Retroviren, die Spumaretroviren. Ihren Namen verdanken die FVs der Ausbildung von multinukleären Synzytien und multiplen Vakuolen in Epithelzellen, die ein schaumiges (eng. *foamy*) Aussehen aufweisen (Aguzzi, 1993; Meiering und Linial, 2001). Zuerst wurden FVs im Nierengewebe eines Makaken entdeckt (Enders und Peebles, 1954) und später auch aus dem menschlichen Gewebe eines Nasopharynx-Karzinoms isoliert (Achong *et al.*, 1971). Dieses Isolat hat zur anfänglichen Namensgebung des Humanen Foamyvirus (HFV) geführt. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie des HFV mit anderen FVs aus Primaten hat man jedoch bald erkannt, dass es sich bei HFV um ein Affenvirus handelt und es in Prototypes Foamyvirus (PFV) umbenannt (Herchenröder *et al.*, 1994). Neben Primaten können FVs auch Katzen, Rinder und Pferde infizieren (Roy *et al.*, 2003; Tobaly-Tapiero *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 1995) und hier als Provirus im Wirtsgenom im latenten Zustand persistieren (Switzer *et al.*, 2004). Eine Übertragung von FVs von Mensch zu Mensch konnten bis heute nicht nachgewiesen wurden (Heneine *et al.*, 2003). Deshalb wird angenommen, dass ursprünglich eine Übertragung vom Affen, auf den Menschen stattgefunden haben muss. Solche Zoonosen wurden bei Zoowärtern auf Grund von Affenbissen bereits zuvor beobachtet (Heneine *et al.*, 2003; Betsem *et al.*, 2011). Die fehlende Pathogenität, der breite Zelltropismus und der Umstand, dass FVs bis zu 14.000 Kilobasen (kb) nichtvirale genetische Informationen aufnehmen und an Stellen repetitiver

DNA-Elemente in das humane Genom integrieren können, machen FVs zu einem wertvollen Vektorsystem für die Gentherapie (Trobridge *et al.*, 2002; Trobridge und Russell, 2004; Russell und Miller, 1996; Trobridge *et al.*, 2006). Neue Ansatzpunkte für die Behandlung von HIV mit Hilfe der Gentherapie basieren ebenfalls auf retroviralen Vektoren. Hierbei haben sich FVs als sehr gut geeignete Vektorsysteme für den Transport von HIV-inhibierenden Genen erwiesen (zusammengefasst in (Olszko und Trobridge, 2013)). Unter diesen Gesichtspunkten ist ein möglichst umfassendes Verständnis der molekularen und biochemischen Abläufe in FVs, wie z.B. SFVmac ein wichtiges Ziel in der Wissenschaft und ein Schwerpunkt dieser Arbeit.

## 1.2 Genomaufbau von SFVmac und HIV-1

Das typische retrovirale Genom beinhaltet die drei kanonischen Leseraster *gag*, *pol* und *env*, welche von langen terminalen Wiederholungssequenzen (*long terminal repeats*, LTR) flankiert werden (Muesing *et al.*, 1985). Zwar entspricht der Genomaufbau der beiden Retroviren HIV-1 und SFVmac diesem grundlegenden Muster, zahlreiche Unterschiede werden jedoch auf Translationsebene und bei der Prozessierung der Vorläuferproteine deutlich. Während im SFVmac *gag* für das Strukturprotein p71 bzw. dessen Schnittprodukte p68 und p3 kodiert, werden im HIV-1 mittels *gag* die Matrix- (MA), Kapsid- (CA), und Nukleokapsidproteine (NC) synthetisiert (vgl. Abb. 1 A und B) (Yu *et al.*, 1996; Flügel und Pfrepper, 2003; Pfrepper *et al.*, 1999).



**Abb. 1: Genom und Vorläuferproteine (A) des SFVmac und (B) des HIV-1.** Gezeigt sind jeweils für SFVmac und HIV-1 die kanonischen Gene *gag*, *pol* und *env* und die Vorläuferproteine für Gag und Pol; *LTR*: lange terminale Wiederholungssequenzen; P: Hauptpromotor; IP: interner Promotor; Gene für akzessorische Proteine im SFVmac: *tas* und *bet* und im HIV-1: *vpr*, *vif*, *vpu*, *tat*, *rev* und *nef*. Pfeile über den Vorläuferproteinen symbolisieren die späteren Schnittstellen in Gag und Pol durch die Protease; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; IN: Integrase; MA, CA und NC: Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsid Proteine; (A: FV Genom abgewandelt nach (Rethwilm, 2010); B: HIV Genom modifiziert nach (Huet *et al.*, 1990).

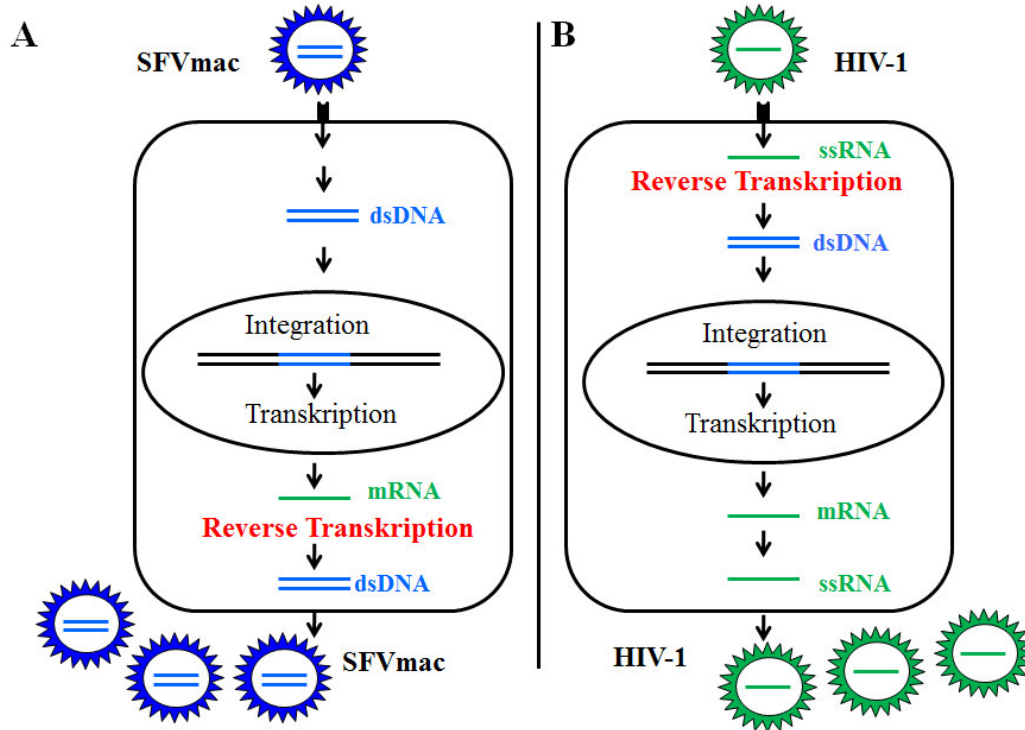
Beiden Viren sind die im *pol* Gen kodierten Enzyme Protease (PR), RT und Integrase (IN) gemeinsam (zusammengefasst in (Goff, 2007)). Dennoch werden diese Proteine in den beiden Viren unterschiedlich exprimiert und prozessiert. Im Gegensatz zum Gag-Pol Fusionsprotein von HIV-1 wird bei FVs das Pol

Polyprotein unabhängig von Gag von einer separaten, gespleißten mRNA translatiert (Löchelt und Flügel, 1996; Enssle *et al.*, 1996). Hieraus resultiert ein Pol Vorläuferprotein, welches lediglich eine Schnittstelle zwischen dem PR-RT Fusionsprotein und der IN aufweist (Abb. 1A) (Roy und Linial, 2007). Das multifunktionale Protein PR-RT von SFVmac vereint damit die katalytischen Eigenschaften von PR, Polymerase und Ribonuklease H (RNase H) in einem Enzym. Bei HIV-1 wird während des Reifungsprozesses sowohl die PR als auch die IN von der RT abgespalten. Für die Ausbildung des HIV-1 RT Heterodimers, auf das in Kapitel 1.5 näher eingegangen wird, sind die Untereinheiten p66 und p51 notwendig (vgl. Abb. 1B) (Di Marzo Veronese *et al.*, 1986). Im Gegensatz zu einfachen Retroviren, wie RSV oder MoMLV, weisen die komplexen Retroviren HIV-1 und SFVmac zusätzliche regulatorische und akzessorische Proteine auf. Bei SFVmac werden am internen Promotor (IP) das akzessorische Protein Bet und das regulatorische Protein Tas und exprimiert. Als transkriptioneller Transaktivator verstärkt Tas nicht nur die eigene Expression am IP, sondern führt nach Akkumulation auch zur Aktivierung des Hauptpromotors (P) im 5'-LTR und damit zur Expression aller Gene (Keller *et al.*, 1991; Kang *et al.*, 1998). Bet ist ein viraler Antagonist der zellulären Cytidin-Deaminase APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide like 3G*), die Bestandteil des humoralen Immunsystems des Wirtes ist. In Abwesenheit von Bet werden Mutationen (Guanin zu Adenin) hervorgerufen und damit die Reverse Transkription gestört (Löchelt *et al.*, 2005; Perkovic *et al.*, 2009; Russell *et al.*, 2005). Bei HIV-1 gibt es vier akzessorischen Proteine Vpr, Vpu, Nef, und Vif, sowie zwei regulatorischen Proteine Tat und Rev, die unterschiedliche Funktionen im retroviralen Lebenszyklus erfüllen (vgl. Abb. 1B) (zusammengefasst in (Cullen, 1998)).

### 1.3 Der retrovirale Replikationszyklus

Die Replikationszyklen von SFVmac und HIV-1 weisen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. Im ersten Schritt der viralen Replikation muss das Virus in die Wirtszelle gelangen. FV können aufgrund ihres breiten Zelltropismus, der auf einen ubiquitären viralen Oberflächenrezeptor schließen lässt, verschiedenste Zellarten und Organismen infizieren. Gegenwärtige Studien haben gezeigt, dass Heparansulfat als Rezeptor für FVs dienen kann (Nasimuzzaman und Persons, 2012; Plochmann *et al.*, 2012). Die Interaktion mit dem Rezeptor ermöglicht es FVs mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen zu werden. Obwohl nicht eindeutig geklärt ist welche Faktoren die Freisetzung des Kapsids bewirken, scheint bei einigen FVs eine Änderung des pH-Werts entscheidend zu sein (Stirnnagel *et al.*, 2012; Picard-Maureau *et al.*, 2003). Die Aufnahme von HIV in die Zelle setzt eine Interaktion der viralen Oberflächenproteine (gp120/gp41) mit dem CD4-Rezeptor sowie einem Chemokin-Korezeptor auf der Oberfläche von T4-Helferzellen bzw. Makrophagen voraus (Klatzmann *et al.*, 1984; Dalgleish *et al.*, 1984). Im Wege der rezeptorvermittelten Membranfusion wird dann das HIV-1 Kapsid in die Wirtszelle aufgenommen. Das charakteristische Unterscheidungsmerkmal zwischen HIV und SFVmac betrifft

allerdings die Natur ihres Genoms im Kapsid. Diese ist vom Zeitpunkt der Reversen Transkription im Lebenszyklus abhängig (vgl. Abb. 2A und B). Orthoretroviren wie HIV-1 verfügen über ein diploides ssRNA Genom in Plusstrangorientierung, das kurz nach dem Eindringen in die neuinfizierte Zelle, im Wege der Reversen Transkription in dsDNA umgeschrieben wird (zusammengefasst in (Goff, 2007)). Im Anschluss wird die dsDNA, als Teil des Präintegrationskomplexes in den Zellkern transportiert und durch die virale IN in das Wirtschromosom integriert. Folglich sind Orthoretroviren RNA-Viren, die sich über ein DNA-Intermediat vermehren (vgl. Abb. 2B). In diesem Zusammenhang weisen FVs eine Besonderheit unter den Retroviren auf. Hier findet die Reverse Transkription der genomischen RNA in dsDNA innerhalb des neu assemblierten Kapsids in der virusproduzierenden Zelle und somit vor dem Eintritt in die nächste Wirtszelle statt (vgl. Abb. 2A). Infektiöse Viruspartikel von SFVmac enthalten deshalb hauptsächlich dsDNA und können unmittelbar nach dem Eindringen in die Wirtszelle in das Wirtschromosom integriert werden (Yu *et al.*, 1999; Moebes *et al.*, 1997).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des (A) SFVmac und (B) HIV-1 Lebenszyklus.** Gezeigt sind die wichtigsten Schritte im Replikationszyklus des SFVmac und HIV-1. (A) Das SFVmac-Kapsid enthält dsDNA (blau), die direkt in das Wirtsgenom (schwarz) integriert werden kann. Vor dem Verlassen der Zelle erfolgt die Reverse Transkription (rot), wobei die prägenomische RNA (grün) in dsDNA umgeschrieben wird und als solche die Wirtszelle im Kapsid verlässt. (B) Der Lebenszyklus von HIV-1 beginnt mit der Reversen Transkription der genomischen, viralen ssRNA (grün) in dsDNA, gefolgt von der Integration ins Wirtschromosom.

Zusätzliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen SFVmac und HIV-1 werden bei näherer Betrachtung weiterer Abläufe im Lebenszyklus deutlich. Für die Transkription viraler Gene und ihre Translation in Proteine nutzen beide Retroviren die Proteinkomplexe des Wirtes. Virale Oberflächenproteine werden in das Endoplasmatische Retikulum (ER) translatiert und zur Zellmembran

befördert (zusammengefasst in (Meiering und Linial, 2001; Hunter, 1994)). In mit HIV-1 infizierten Zellen sind neben Env-Proteinen auch Gag-Proteine an der Zellmembran zu finden. Eine Myristylierung am aminoterminalen Ende von Gag dient der Verankerung von Gag-Pol-Vorläuferproteinen in der Zellmembran und fördert hier die Kapsidassemblierung über Gag-Interaktionen (Bryant und Rather, 1990). Nach dem Verlassen der Zelle durch Abschnürung wird die Reifung des Kapsids eingeleitet. Erst dann erfolgt die Aufspaltung des Gag-Pol Vorläuferproteins in die Strukturproteine MA, NC und CA, sowie die RT und IN. Insofern hat das HIV, durch eine verspätete Spaltung des Gag-Pol Vorläuferproteins, eine elegante Lösung für die Verpackung aller Strukturproteine in das Kapsid gefunden (zusammengefasst in (Hill *et al.*, 2005)). Im Gegensatz hierzu erfolgt im FV die Pol-Synthese unabhängig von Gag. Dies wirft die Frage nach dem Verpackungsmechanismus von Pol in das FV-Kapsid auf. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist diese Fragestellung bis heute nicht eindeutig geklärt. Obwohl auch Theorien über eine direkte Wechselwirkung zwischen Gag und Pol existieren, lässt die Mehrheit an Studien auf eine Funktion der genomischen RNA als Bindeglied zwischen Pol und Gag bei der Verpackung von Pol schließen (Yu *et al.*, 1996; Heinkelein *et al.*, 2002; Lee und Linial, 2008). Im Vergleich zu HIV-1 führt dieser Verpackungsmechanismus zu einer niedrigeren Anzahl an Pol bzw. PR-RT Molekülen im Kapsid von FVs und damit bei der Durchführung der Reversen Transkription. Ein Ausgleich der niedrigeren Enzymmenge kann hier jedoch durch eine höhere Polymeraseaktivität der FV PR-RT erzielt werden (Boyer *et al.*, 2004). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ungeachtet der Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen HIV-1 und SFVmac, die Reverse Transkription eine Schlüsselrolle im gesamten Replikationsprozess von beiden Retroviren einnimmt.

#### 1.4 Die Reverse Transkription

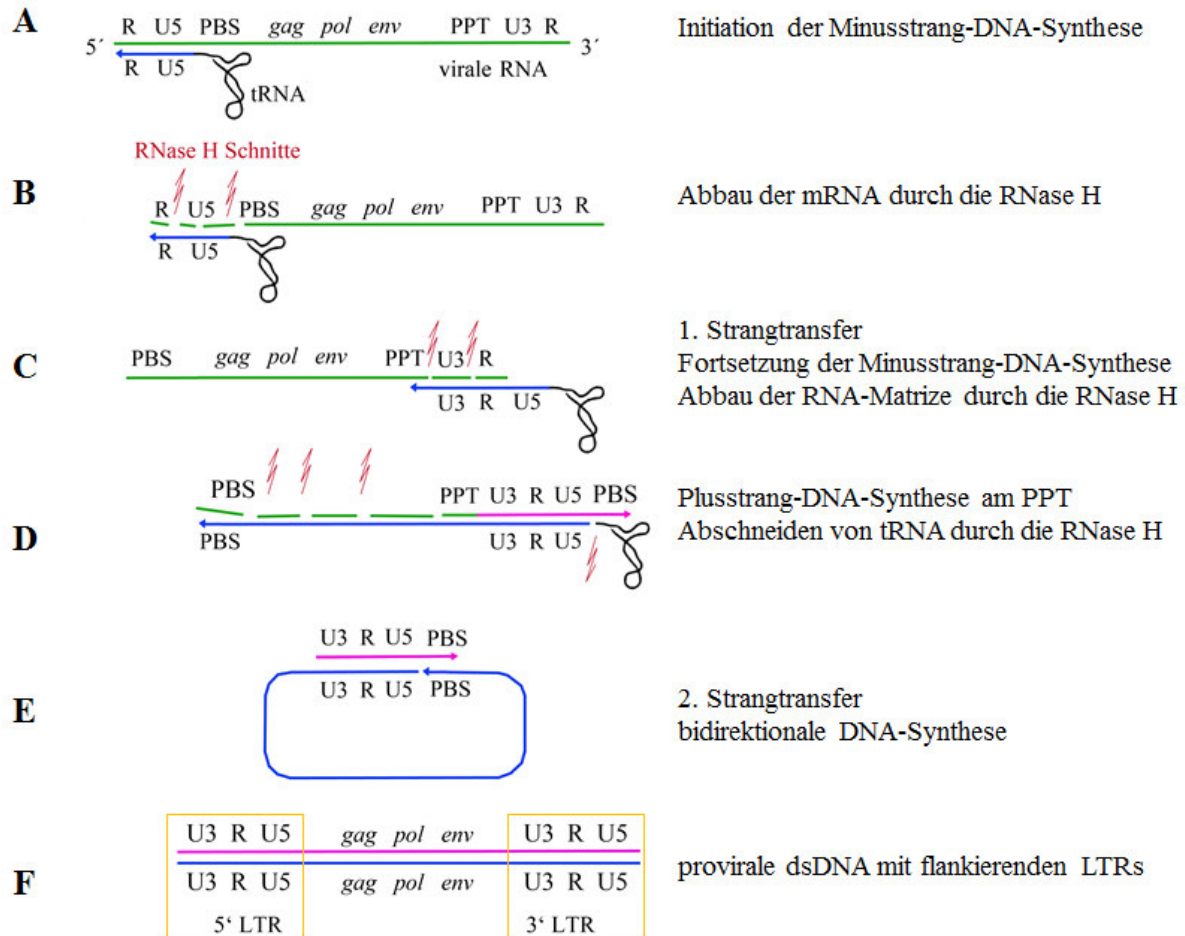
Das Enzym RT katalysiert in allen Retroviren die Reverse Transkription von ssRNA in dsDNA. Hierfür vereint die RT drei unterschiedliche katalytische Aktivitäten:

- die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität
- die DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität
- die RNase H-Aktivität für den Abbau der RNA-Matrize

In allen Retroviren läuft die Reverse Transkription stets von 5' - in 3' -Richtung nach demselben Schema ab und lässt sich in mehrere Schritte unterteilen. Der erste Schritt beinhaltet die Synthese der Minusstrang-DNA (Abb. 3A). Hierbei verwenden Retroviren unterschiedliche Sorten der zellulären Transfer-RNA (tRNA) als Primer. FVs nutzen die tRNA<sup>Lys 1,2</sup> und das HIV-1 die tRNA<sup>Lys 3</sup> (Raba *et al.*, 1979; Maurer *et al.*, 1988). Die tRNA hybridisiert mit der 18 Nukleotide langen Primerbindungsstelle (PBS) neben der U5 Region im RNA-Genom. Es folgt die RNA-abhängige DNA-Synthese bis zum 5'-Ende der RNA-Matrize. Während dieses Vorgangs werden die R- und U5-Region der RNA-Matrize durch die RNase H-Aktivität der RT abgebaut (Abb. 3B). Das neu synthetisierte Minusstrang-DNA-



Fragment enthält die komplementäre Sequenz zur R-Region, welche am 5' und am 3' Ende der viralen RNA in identischer Ausführung anzutreffen ist (Haseltine *et al.*, 1977). Damit kann die Minusstrang-DNA mit der R-Region auf der RNA am 3'-Ende hybridisieren und die DNA-Synthese fortgesetzt werden (Abb. 3C). Dieser Prozess der erneuten Hybridisierung am 3'-Ende des RNA Genoms wird als erster Strangtransfer oder erster Sprung bezeichnet. Parallel zur Synthese der Minusstrang-DNA wird die RNA im gebildeten RNA/DNA-Hybrid erneut von der RNase H abgebaut (Abb. 3C/D) (zusammengefasst in (Goff, 2007)).



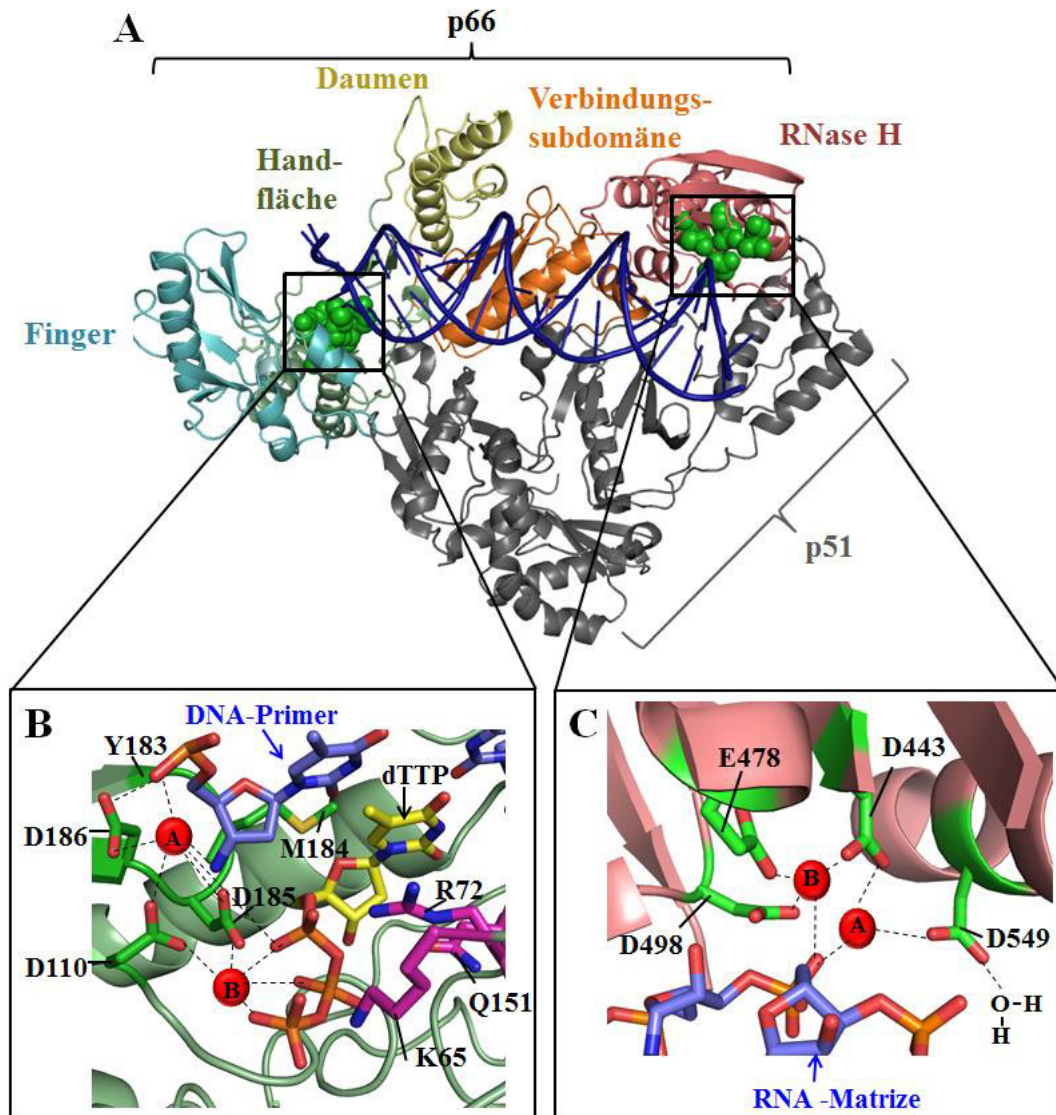
**Abb. 3: Allgemeine schematische Darstellung der Reversen Transkription in Retroviren.** Die Schritte (A) bis (F) sind stichpunktartig kommentiert und genauer im Text erläutert. Die virale RNA ist grün, Minusstrang-DNA blau und Plusstrang-DNA rosa dargestellt. PBS: Primerbindungsstelle; R: repetitive Sequenzen; PPT: purinreicher Sequenzabschnitt; tRNA<sup>Lys</sup>: Transfer-Ribonukleinsäure Lysin; U3 und U5: unikale 3' und 5' Region.

Von der RNase H-Degradation nicht betroffen ist der purinreiche Sequenzabschnitt: PPT (*polypurine tract*) (Kupiec *et al.*, 1988; Charneau *et al.*, 1992). Der PPT wird im nächsten Schritt der Plusstrang-DNA-Synthese von der RT als Primer verwendet und bis zur PBS (ersten 18 Nukleotide der tRNA) verlängert (Abb. 3D) (Smith *et al.*, 1984). Im nächsten Schritt werden auch die verbliebenen RNA-Primer PPT und tRNA durch die RNase H abgeschnitten (Smith und Roth, 1992). Auf diese Weise entstehen zwei

Fragmente, Minus- und Plusstrang-DNA, welche jeweils am 3'-Ende komplementäre Sequenzen der PBS besitzen und hier intramolekular miteinander hybridisieren können (Abb. 3E). Dies wird als zweiter Strangtransfer bezeichnet. Das Resultat ist eine zirkuläre partiell doppelsträngige DNA bestehend aus Plus- und Minusstrang. Im letzten Schritt der Reversen Transkription werden beide DNA-Stränge zur vollständigen proviralen dsDNA mit zwei identischen U3-R-U5 Regionen, auch als LTRs bezeichnet, verlängert (Abb. 3F) (zusammengefasst in (Goff, 2007)).

## 1.5 Das Enzym Reverse Transkriptase im HIV-1

Wie bereits im Prozess der Reversen Transkription veranschaulicht, ist das Enzym RT für die Replikation des viralen Genoms verantwortlich. Die erste hochauflösende Struktur der HIV-1 RT wurde mit Hilfe der Kristallographie gelöst (Kohlstaedt *et al.*, 1992). Es handelt sich um ein Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten p66 und p51, wobei p51 durch Abspaltung der RNase H von p66 gebildet wird (Di Marzo Veronese *et al.*, 1986; Hostomsky *et al.*, 1992; Jacobo-Molina *et al.*, 1992). Diese Spaltungsstelle wird jedoch erst nach der Ausbildung eines p66/p66 Homodimers im Wege der Umstrukturierung einer p66 Untereinheit zugänglich (Sluis-Cremer *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2014; Sharaf *et al.*, 2014). Aufgrund dieser Umstrukturierung unterscheiden sich die sequenzidentischen Bereiche in p51 und p66 deutlich in ihrer Sekundärstruktur voneinander. Im späteren Heterodimer ist nur p66 katalytisch aktiv, während p51 hauptsächlich stabilisierende und strukturelle Bedeutung hat (Hostomsky *et al.*, 1992; Le Grice *et al.*, 1991; Le Grice *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1998). In der p66 Untereinheit ist die Polymerasedomäne mit ihrer Verbindungssubdomäne und die RNase H-Domäne zu finden (vgl. Abb. 4A). Während das RNA/DNA-Hybrid in der katalytischen Furche des Enzyms bindet, werden in allen (Sub)-Domänen Kontakte zum Phosphatrückgrad des Hybrids ausgebildet. Die Struktur der Polymerasedomäne erinnert, wie auch bei anderen Polymerasen (z.B. T7 Polymerase) (Brautigam und Steitz, 1998), an die Form der rechten Hand welche die DNA Doppelhelix umfasst. Aus diesem Grund wurden die weiteren Subdomänen als Finger, Handfläche und Daumen benannt (Jacobo-Molina *et al.*, 1993). Das katalytisch aktive Zentrum in der Handfläche der Polymerase beinhaltet die Aspartat-Triade D110, D185 und D186, wobei sich die beiden letztgenannten Aspartatreste in der HIV-1 RT mit Y183 und M184 zum hochkonservierten YXDD Motiv, das allen retroviralen RTs gemeinsam ist, zusammensetzen (Poch *et al.*, 1989; Arnold *et al.*, 1992). Eine detaillierte Darstellung dieses Bereiches in Abb. 4B zeigt wie zwei Mg<sup>2+</sup>-Ionen (A und B) von der Aspartat-Triade sowie den Phosphatgruppen des einzubauenden Desoxythymidintriphosphats (dTTP) koordiniert werden. Weitere Wechselwirkungen der Phosphate im dTTP mit den Resten K65 sowie R72 in der Fingersubdomäne bzw. Q151 in der Handfläche der Polymerase stabilisieren zusätzlich die Nukleotidbindung im Enzym (Abb. 4A).



**Abb. 4:** (A) Sekundärstruktur des HIV-1 RT Heterodimers p66/p51 mit RNA/DNA Hybrid und (B/C) Vergrößerungen der beiden aktiven Zentren. (A) Die HIV-1 RT kann in die beiden Untereinheiten p66 (eingefärbt) und p51 (grau) unterteilt werden. Bestandteile der p66 Untereinheit sind die Polymerase- und RNase H-Domäne. Die katalytisch aktiven Zentren sind hier als grüne Kugeln dargestellt. Die Polymerasedomäne entspricht in ihrem Aufbau dem Modell der „rechten Hand“ und kann in die Subdomänen Daumen, Finger, Handfläche und die Verbindungssubdomäne unterteilt werden. Die RNA/DNA Doppelhelix bindet hier in der Furche zwischen Daumen und Finger. In der Handfläche ist auch das aktive Zentrum mit den konservierten Resten Y183, M184, D185 und D186 lokalisiert. (B) Eine Vergrößerung dieses Bereichs zeigt, dass neben D186 und D185 auch D110 an der Koordination der zweiwertigen  $Mg^{2+}$  Ionen (rote Kreise, A und B) beteiligt ist. Die Phosphatreste (im Primer und dTTP) sind orange und rot hervorgehoben. Alle Interaktionen mit den  $Mg^{2+}$ -Ionen sind durch unterbrochene Striche angezeigt. Während das 3'-OH am Ende des Primes mit dem  $Mg^{2+}$  (A) interagiert, wird das dTTP zusätzlich mittels der Reste Q151, R72 und K65 stabilisiert (abgewandelt nach (Abram *et al.*, 2014)). (C) Das aktive Zentrum der RNase H-Domäne beinhaltet ebenfalls zwei  $Mg^{2+}$ -Ionen (rote Kreise, A und B), die von den vier Resten D498, E478, D443 und D549 koordiniert werden. Die Phosphate im Matrizenstrang sind wie in B angefarbt. Für die Hydrolyse der RNA-Matrize finden hier zusätzlich Wechselwirkungen zwischen D549 und einem Wassermolekül statt (modifiziert nach (Beilhartz und Götte, 2010)). Die Strukturen wurden mittels PyMOL und der folgenden PDB Dateien erstellt: (A) 1HYS (RT mit RNA/DNA Hybrid); (B) 1RTD (RT mit DNA und dTTP) und (C) Überlagerung der PDB Dateien 1HYS und 3LP1 (HIV-1 RNase H mit zwei  $Mg^{2+}$  Ionen).

In der katalytischen Reaktion aktiviert das  $Mg^{2+}$ -Ion in Position A (Abb. 4B) die 3'-OH Gruppe am 3'-Ende des Primers und ermöglicht hierdurch den nukleophilen Angriff dieses Sauerstoffs am  $\alpha$ -Phosphat des dTTPs, was in einer neuen Phosphodiesterbindung zum dTMP sowie der Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) resultiert (Ding *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998). Für die Reverse Transkription von ssRNA in dsDNA muss neben dem dNTP-Einbau mittels der Polymerase auch der Abbau der RNA-Matrize im DNA/RNA Hybrid sichergestellt werden. Hierfür ist die Endonuklease RNase H, welche sich am C-Terminus der p66 Untereinheit in der HIV-1 RT befindet, verantwortlich (Abb. 4A) (Schatz *et al.*, 1989). Die hochkonservierten Reste D498, E478, D443 und D549 im aktiven Zentrum der RNase H koordinieren, wie schon in der Polymerasedomäne, zwei  $Mg^{2+}$ -Kationen A und B (vgl. Abb. 4C) (Ben-Artzi *et al.*, 1992). In der Hydrolysereaktion deprotoniert das  $Mg^{2+}$  Ion A ein Wassermolekül, welches von D549 koordiniert wird. Dies ermöglicht einen nukleophilen Angriff des  $OH^-$ -Ions am Phosphat zwischen den Nukleotiden des RNA Stranges. Es entsteht ein pentavalenter Übergangszustand, wobei das Sauerstoffatom der angegriffenen Phosphodiesterbindung durch das  $Mg^{2+}$ -Ion B stabilisiert wird. Durch eine erniedrigte Aktivierungsenergie im Übergangszustand wird die Spaltung der Phosphodiesterbindung im Phosphatrückgrad der RNA begünstigt (Steitz und Steitz, 1993). Auf diese Weise kann die RNA-Matrize während der Synthese des komplementären DNA-Stranges (*complementary DNA*, cDNA) in der Reversen Transkription abgebaut werden. Insgesamt sind die Reste in katalytischen Zentren von RTs innerhalb der retroviralen Familie hoch konserviert. Deshalb können Forschungsergebnisse zu RTs, wie z.B. der SFVmac PR-RT für ein besseres Verständnis der katalytische Reaktion in der HIV-1 RT genutzt werden.

## 1.6 Die Protease-Reverse Transkriptase des SFVmac

Im Gegensatz zu HIV-1 wird bei SFVmac die RT nicht von der PR abgespalten, sondern ist ein Teil des multifunktionalen, monomeren Fusionsproteins PR-RT. Somit bleiben PR und RT miteinander verbunden und vereinen damit die katalytischen Funktionen von PR, Polymerase und RNase H in einem Protein.

### 1.6.1 Die Protease der PR-RT von SFVmac

Obwohl die Sekundärstruktur der SFVmac PR-RT noch nicht aufgeklärt werden konnte, wurde die Struktur der PR-Untereinheit am Lehrstuhl Biopolymere gelöst (Hartl *et al.*, 2007). Wie die PR von HIV-1 gehört die SFVmac PR zur Familie der Aspartatproteasen, welche als Homodimere aktiv sind und Polypeptidketten hydrolytisch spalten (Pearl und Taylor, 1987; Katoh *et al.*, 1989). Anders als die HIV-1 PR liegt die SFVmac PR-RT in Lösung als monomeres Protein vor (Hartl *et al.*, 2008). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die SFVmac PR mittels des sogenannten PR-aktivierenden-RNA-Motivs (*PR activating motif*, PARM), welches in der *pol* Region der viralen genomischen RNA lokalisiert ist, aktiviert werden kann (Hartl *et al.*, 2011). Da retrovirale PRs nur als Dimere aktiv sind, muss PARM die

Ausbildung von transienten PR-RT-Homodimeren im SFVmac begünstigen (Hartl *et al.*, 2011; Hartl *et al.*, 2010). Das aktive Zentrum für die Proteolyse ist in einer Substratbindungstasche zwischen den beiden identischen Untereinheiten des Homodimers positioniert und beinhaltet zwei katalytisch aktive Aspartatreste, jeweils eins aus jeder der beiden Untereinheiten (Dunn *et al.*, 2002). Die SFVmac PR-Aktivität ermöglicht die Prozessierung der beiden Vorläuferproteine Gag und Pol. Das Gag-Protein p71 wird während der Virusreifung nur einmal am C-Terminus geschnitten (Pfrepper *et al.*, 1999). Dieser Prozess liefert die beiden Spaltprodukte p3 und p68 und ist für die erfolgreiche virale Replikation und Kapsidassemblierung absolut notwendig (Enssle *et al.*, 1997; Zemba *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 1998). Das gereifte Kapsid setzt sich dann aus dem ungeschnittenen p71 sowie dem prozessierten p68 im Verhältnis 1:4 zusammen (Cartellieri *et al.*, 2005a; Cartellieri *et al.*, 2005b). In diesem Zusammenhang ist nicht nur die Menge an Gag-Spaltprodukten, sondern auch der Zeitpunkt der Proteolyse von Gag für das virale Überleben entscheidend. So müssen z.B. im Lebenszyklus von FVs alle proteolytischen Schnitte vor der Reversen Transkription abgeschlossen sein, da während der cDNA Synthese die PARM-kodierende genomische RNA durch die RNase H abgebaut wird und danach eine Aktivierung der PR nicht mehr möglich ist. Der Schnitt im Pol-Vorläuferprotein erfolgt zwischen PR-RT und IN, woraufhin die IN Tetramere ausbilden und die retrovirale dsDNA in das Wirtsgenom integrieren kann (Flügel und Pfrepper, 2003). Da Pol als ein PR-RT-IN Vorläuferprotein exprimiert und in das Kapsid verpackt wird ist hier eine verfrühte Abspaltung der IN für deren Verpackung ungünstig. Aus diesem Grund müssen Zeitpunkt und Dauer der PR-Aktivierung durch PARM genau auf den Lebenszyklus von FVs abgestimmt sein. Welche Mechanismen dies steuern ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt.

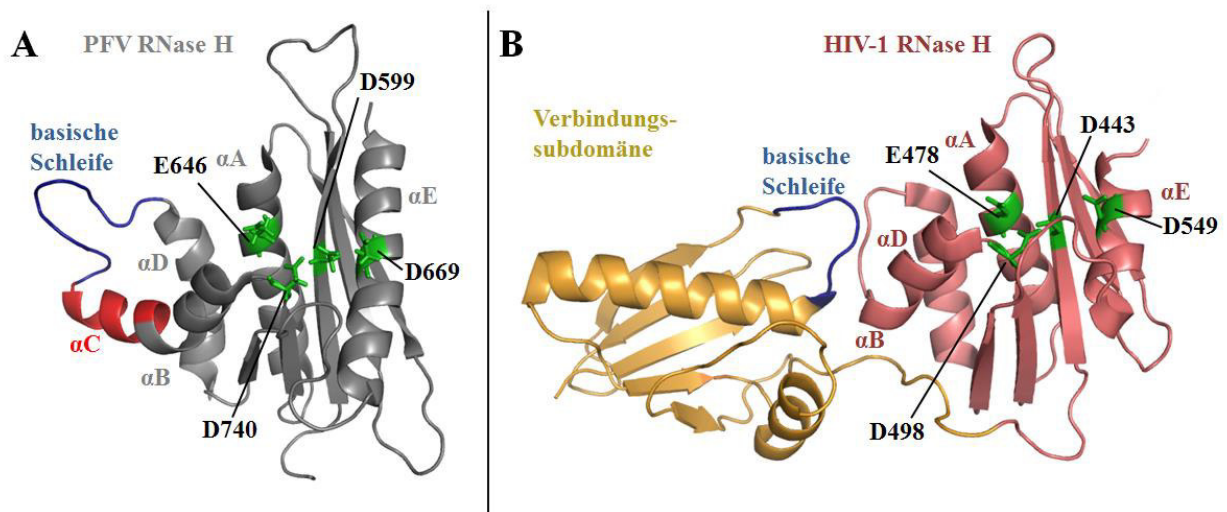
### 1.6.2 Die Polymerasedomäne der SFVmac PR-RT

Die SFVmac RT im PR-RT Fusionsprotein ist zwar ein Monomer, entspricht jedoch in ihrem Domänenaufbau der p66 Untereinheit der HIV-1 RT (vgl. Abb. 4). Folglich kann die SFVmac RT ebenfalls in Polymerase-, und RNase H-Domäne unterteilt werden. Wie bei XMRV und MoMLV beinhaltet auch die FV RT im aktiven Zentrum der Polymerasedomäne ein Valin an zweiter Stelle des hochkonservierten YXDD Motivs. Ein Austausch des Valins gegen ein Methionin, entsprechend dem Motiv YMDD aus HIV-1, ist bei FVs mit einem enormen Aktivitätsverlust verbunden (Rinke *et al.*, 2002). Dies lässt auf strukturelle Unterschiede zwischen SFVmac und HIV-1 RT, selbst im Bereich des konservierten aktiven Zentrums schließen. Bis heute konnte die genaue Struktur der SFVmac Polymerasedomäne nicht gelöst werden. Es existieren jedoch bereits Strukturen von Polymerasedomänen aus anderen retroviralen monomeren RTs, wie der XMRV RT mit RNA/DNA Hybrid (Nowak *et al.*, 2013), sowie der MoMLV RT ohne Substrat (Das und Georgiadis, 2004). Wie schon für HIV-1 in Abb. 4A gezeigt, werden auch in monomeren RTs zwei  $Mg^{2+}$  Ionen von Aspartatresten im

Polymerisationszentrum koordiniert (Cote und Roth, 2008). Dies lässt einen ähnlichen katalytischen Mechanismus wie in der HIV-1 RT vermuten. Da die monomere RT keine zusätzliche Stabilisierung durch eine zweite Untereinheit erfährt, erlaubt hier die Verbindungssubdomäne mehr Flexibilität zwischen der Polymerase und RNase H Domäne, im Vergleich zum HIV-1 Heterodimer. Dennoch werden in Anwesenheit von dsDNA alle (Sub)-Domänen der RT durch Interaktionen mit dem Phosphatrückgrad der dsDNA an das Substrat fixiert und hierdurch die Flexibilität eingeschränkt (Nowak *et al.*, 2013; Cote und Roth, 2008). Aufgrund der Verbindungssubdomäne konnten auch wechselseitige Einflüsse zwischen Polymerase- und RNase H-Aktivität beobachtet werden (Schultz und Champoux, 1996; Zhan und Crouch, 1997). Dies verdeutlicht die enge strukturell-funktionelle Beziehung zwischen Polymerase- und RNase H-Domäne auch in monomeren RTs, wie der SFVmac RT.

### 1.6.3 Die RNase H-Domäne in der SFVmac PR-RT

Die RNase H kommt sowohl als ein eigenständiges Enzym in *Escherichia coli* (*E. coli*), als auch als Domäne in der retroviralen RT vor. Ungeachtet ihres Ursprungs weist sie stets das hochkonservierte DEDD Motiv im aktiven Zentrum, sowie eine Struktur bestehend aus fünf  $\beta$ -Faltblättern, welche von vier bis fünf  $\alpha$ -Helices flankiert werden, auf (Abb. 5) (Davies *et al.*, 1991; Katayanagi *et al.*, 1990).



**Abb. 5: RNase H-Domänen aus (A) PFV und (B) HIV-1.** (A) Die Reste des aktiven Zentrums der PFV RNase H, bestehend aus den Aminosäureresten D599, E646, D669 und D740 sind grün hervorgehoben. Die basische Schleifenregion ist blau und die C-Helix ( $\alpha$ C) rot dargestellt. Helices A bis E sind als solche beschriftet. Die Abbildung wurde mit PyMOL und der PDB Datei 2LSN erstellt. (B) Verbindungssubdomäne und RNase H Domäne aus der HIV-1 RT sind als solche beschriftet. Der dunkelblau angefärbte basische Bereich in der Verbindungssubdomäne übernimmt in der HIV-1 RNase H die Funktion einer basischen Schleife der FV RNase H. Reste im aktiven Zentrum und Helices sind wie in (A) beschriftet. Die Abbildung basiert auf der PDB Datei 1HYS.

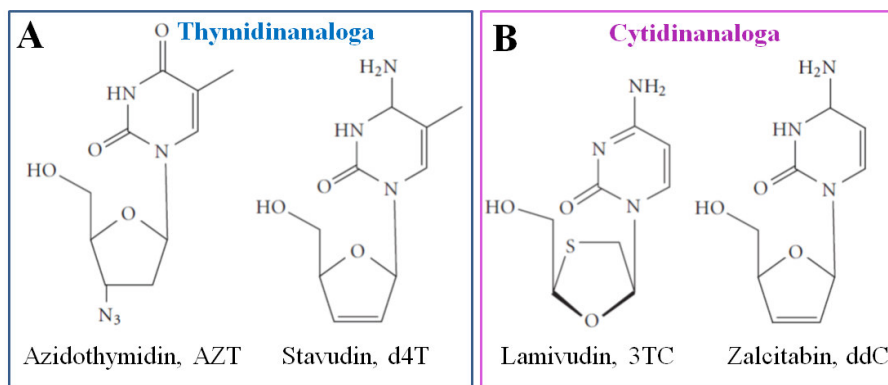
NMR Untersuchungen konnten zeigen, dass im aktiven Zentrum zwei  $Mg^{2+}$  Ionen von den Aspartatresten und einem Glutamatrest koordiniert werden (Pari *et al.*, 2003). Diese konservierte Struktur wurde auch bei RNase H-Domänen monomerer RTs aus MoMLV oder dem PFV nachgewiesen (Lim *et al.*, 2006; Leo *et*

al., 2012b). Allerdings verfügen diese RNase H-Enzyme, wie auch die RNase H aus *E. coli*, über eine basische Schleifenregion welche auch als *basic protrusion* bezeichnet wird (Abb. 5A). Diese Schleifenregion, welche an die C-Helix ( $\alpha$ C) angrenzt, ist für die richtige Positionierung des RNA Substrats und damit für die RNase H-Aktivität essentiell (Katayanagi *et al.*, 1992; Leo *et al.*, 2012a; Leo *et al.*, 2012b). Ein Vergleich der RNase H-Domänen aus PFV und HIV-1 zeigt, dass in der letztgenannten die basische Schleife deutlich verkürzt ist und die C-Helix vollständig fehlt (vgl. Abb. 5A und 5B). Allerdings befindet sich eine basische Schleife in der Verbindungssubdomäne der HIV-1 RT in räumlicher Nähe zur RNase H, welche die korrekte Positionierung des Substrats im aktiven Zentrum unterstützt. Damit übernimmt dieser Bereich in HIV-1 die Funktion der basischen Schleife aus der PFV RNase H. Deshalb ist die isolierte RNase H-Domäne aus HIV-1 ohne Verbindungssubdomäne katalytisch nicht aktiv (Smith *et al.*, 1994). Platziert man jedoch in die isolierten RNase H-Domäne die basische Schleife aus der *E. coli* RNase H an homologer Stelle (zwischen den  $\alpha$ -Helices B und D), so wird auch hier die RNase H-Aktivität beinahe vollständig wiederhergestellt (Keck und Marqusee, 1995; Stahl *et al.*, 1994). Dies verdeutlicht die bedeutende Rolle der basischen Schleife für die Substratbindung und damit einhergehende Aktivität der retroviralen RNase H. Im Gegensatz hierzu besitzen isolierte RNase H-Domänen aus RTs von FVs eine basische Schleifenregion mit C-Helix innerhalb der RNase H und sind damit selbst in Abwesenheit der Verbindungssubdomäne katalytisch aktiv (Leo *et al.*, 2012b; Leo *et al.*, 2012a). Damit können experimentelle Untersuchungen der isolierten PFV RNase H unabhängig von der restlichen RT durchgeführt werden. Medikamente die an der RT ansetzen, beeinträchtigen für gewöhnlich die Polymeraseaktivität. Allerdings haben erste präklinische Studien gezeigt, dass auch die Inhibition der RNase H-Aktivität einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der antiretroviralen Therapie bieten kann (vgl. Kap. 1.9).

## 1.7 Die Hochaktive Antiretrovirale Therapie

Obwohl bis heute kein wirksamer Impfstoff oder gar ein Heilmittel gegen HIV entwickelt werden konnte, existieren zahlreiche Medikamente welche in Kombination aus mindestens drei Wirkstoffen im Rahmen einer Hoch Aktiven Antiretroviralen Therapie (*Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART) verabreicht werden. Um der Entstehung von Resistenzen entgegenzuwirken, sieht das Behandlungskonzept einer HAART die Kombination von mehreren Medikamenten mit verschiedenen Angriffspunkten im viralen Lebenszyklus vor (Schooley *et al.*, 1996; Hogg *et al.*, 1998). Hierbei werden häufig in der Erstlinientherapie mehrere RT Inhibitoren (RTIs) und bei Therapieversagen in der Zweitlinientherapie RTIs mit PR- oder IN-Inhibitoren kombiniert ([http://www.who.int/hiv/topics/treatment/second-line\\_art\\_systematic-review.pdf](http://www.who.int/hiv/topics/treatment/second-line_art_systematic-review.pdf), Stand 20.12.2014). Grundsätzlich kann zwischen zwei Klassen von RTIs, den Nukleosid- oder Nukleotid-RT-Inhibitoren (NRTIs oder NtRTIs) und den Nicht-Nukleosid-RT-Inhibitoren (NNRTIs) unterschieden werden. Bei den

NNRTIs handelt es sich hauptsächlich um aromatische Verbindungen, welche in einer hydrophoben Tasche in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase binden. Dies führt zu Veränderungen in der Sekundärstruktur des aktiven Zentrums, was die Polymerisationsreaktion inhibiert (Ding *et al.*, 1995; Ren *et al.*, 1995). Im Gegensatz hierzu sind die NRTIs Nukleosidanaloga, welche verschiedene Substituenten wie z. B. N<sub>3</sub> oder H anstelle der Hydroxylgruppe an der 3'-Position der Desoxyribose aufweisen. Aber auch Modifikationen innerhalb der Desoxyribose können bei NRTIs wie dem 3TC angetroffen werden (vgl. Abb. 6) (Goldschmidt und Marquet, 2004; Mitsuya und Broder, 1986; Rosenblum *et al.*, 2001; Zimmerman *et al.*, 1987).



**Abb. 6: Chemische Strukturen einiger zugelassener NRTIs:** (A) Zu den Thymidinanaloga gehören das häufig eingesetzte AZT sowie d4T. (B) Typische Cytidinanaloga sind 3TC und ddC (abgewandelt nach (Esposito *et al.*, 2012)).

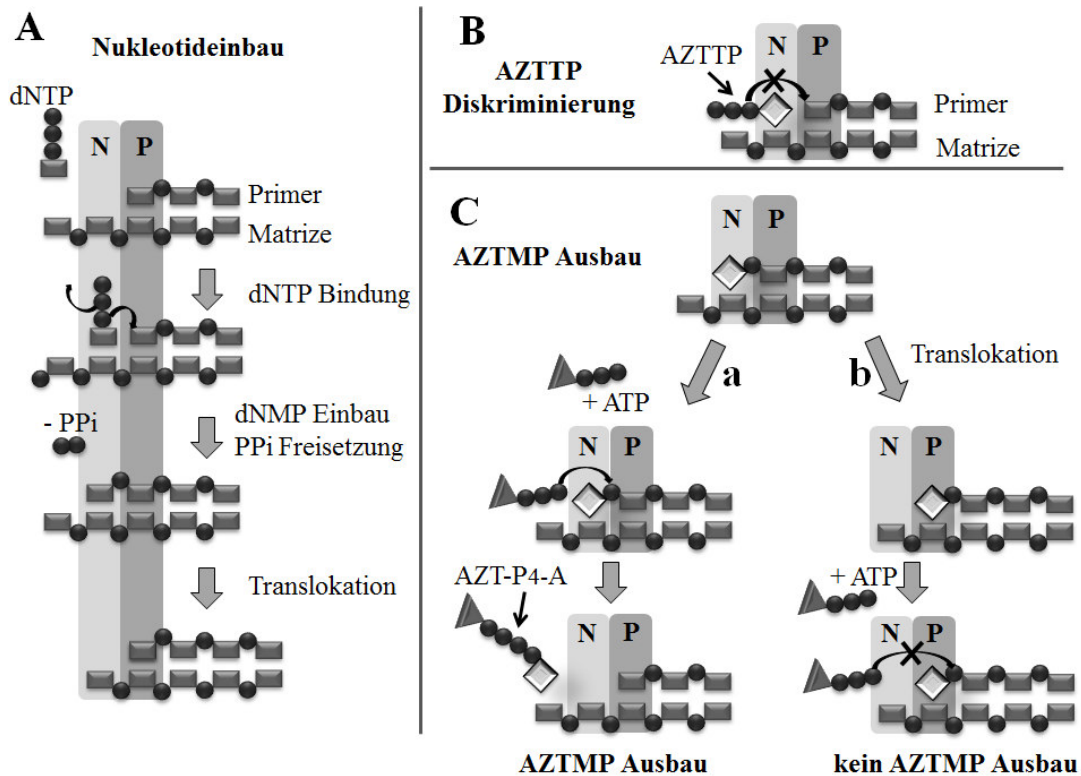
NRTIs werden von der RT als Substrate erkannt und während der Reversen Transkription in den neu synthetisierten cDNA Strang eingebaut. Weil sie auf Grund ihrer Modifikation zum Abbruch der Polymerisation führen, werden sie als Kettenterminatoren bezeichnet.

## 1.8 Die Azidothymidinresistenz

Ursprünglich für die Krebstherapie entwickelt, hat sich das NRTI 3'-Azido-3'-desoxythymidin (Azidothymidin, AZT oder Zidovudin) schon bald als hochwirksamer *in vivo*- und *in vitro*-Inhibitor der HIV-1 RT erwiesen (Rosenblum *et al.*, 2001; St Clair *et al.*, 1987; Mitsuya *et al.*, 1985). Bei diesem Wirkstoff handelt es sich um ein Thymidinanalogon, das an der 3'-Position der Desoxyribose an Stelle einer Hydroxylgruppe eine Azidogruppe besitzt (AZT-Struktur in Abb. 6A). Sobald das AZT in die Zelle gelangt, wird es durch zelluläre Kinasen schrittweise zum aktiven AZT-5'-Triphosphat (AZTTP) phosphoryliert (Furman *et al.*, 1986). Im Gegensatz zu zellulären Polymerasen erkennt die RT das AZTTP 100-fach besser als Substrat und baut es während der Reversen Transkription als AZT-5'-Monophosphat (AZTMP) in den naszierenden DNA-Strang ein (Hanes und Johnson, 2007). Dies führt zum Abbruch der Polymerisation, da eine Phosphodiesterbindung zwischen der Azidogruppe und dem nächsten Nukleotid



nicht ausgebildet werden kann. Grundsätzlich folgt der Einbau von Nucleotiden bzw. Nucleotidanaloga durch retrovirale Polymerasen stets demselben Ablauf (Abb. 7A).



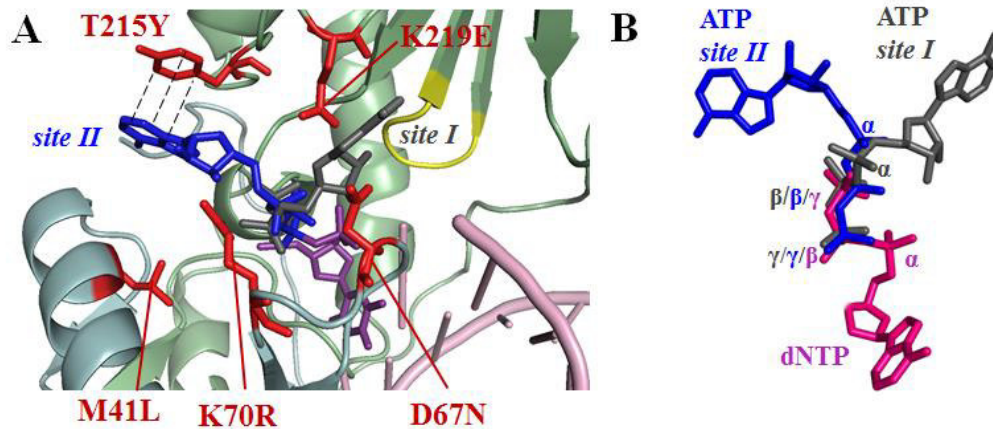
**Abb. 7:** (A) Schema zum Nucleotideinbau durch die RT während der Polymerisation. Gezeigt ist die dNTP-Bindung in der Nucleotidbindungsposition (N-Position, N) der Polymerasedomäne in der RT, der Nucleotideinbau (durch Pfeile angezeigt), die Freisetzung des PPi und die Translokation des 3'-OH-Endes im Primer in die Primerbindungsposition (P-Position, P). (B) AZT-Resistenz durch Diskriminierung. Die Ausbildung der Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-OH Ende des Primers und AZTTP findet nicht statt. (C) AZT-Resistenz durch AZTMP-Ausbau mittels ATP. Wenn kein Diskriminierungsmechanismus vorliegt, wird AZTMP wie ein dNMP eingebaut. (a) Das eingebaute AZTMP wird mittels einer AZT-resistenten RT in Gegenwart von ATP als Tetraphosphat AZT-P<sub>4</sub>-A wieder ausgebaut. (b) Nach der Translokation von AZTMP in die P-Position ist ein Ausbau mittels ATP, wie in (a) gezeigt, nicht mehr möglich. Phosphate sind als Kreise, Nucleoside als Rechtecke, das Adenosin im ATP als Dreieck und das AZT als Raute dargestellt. P- und N-Positionen in der RT sind mit P und N gekennzeichnet (abgewandelt nach (Boyer *et al.*, 2002)).

Nach der Positionierung der DNA-Primer/Matrize in der Furche zwischen Daumen- und Fingersubdomäne der Polymerasedomäne, induziert die Bindung eines Nucleotids in der Nucleotidbindungsposition (N-Position) ein Schließen der Fingersubdomäne um das Substrat. Dies ermöglicht die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem α-Phosphat des dNTPs und dem 3'-Ende des Primers, wobei PPi freigesetzt wird. Es folgt die Translokation des verlängerten 3'-Endes im Primer aus der N-Position in die Primerbindungsposition (P-Position). Hierdurch wird die N-Position für das nächste, komplementäre Nucleotid frei und der Einbauprozess kann von vorne beginnen (zusammengefasst in (Goldschmidt und Marquet, 2004)). Eine hohe Mutationsrate während der Reversen Transkription und kurze Generationszeiten in Retroviren führen häufig zur Entstehung von Resistenzen

gegen Nukleotidanaloga, wie das AZT. Grundsätzlich gibt es zwei Arten von Resistenzmechanismen gegen das AZT. Ein Mechanismus beinhaltet die Diskriminierung beim Einbau in den naszierenden DNA-Strang während der Reversen Transkription. Hierbei wird das AZTTP zwar genau wie ein dNTP gebunden, aber die Konformationsänderung in der Fingersubdomäne und damit die Ausbildung der Phosphodiesterbindung zum AZTMP unterbleibt (Abb. 7B) (Kellinger und Johnson, 2011; Kellinger und Johnson, 2010). Der zweite Resistenzmechanismus basiert auf dem Ausbau des eingebauten AZTMP in Gegenwart von Adenosintriophosphat (ATP) (Abb. 7Ca) (Meyer *et al.*, 1999; Boyer *et al.*, 2001). Hierbei fungiert das ATP als Pyrophosphatdonor und wird zusammen mit dem AZTMP in Form des Dinukleotids, AZT-5'-tetraphospho-Adenosin (AZT-P<sub>4</sub>-A) wieder freigesetzt (Meyer *et al.*, 1998). Im Anschluss kann die Reverse Transkription wie gewohnt fortgesetzt werden. Allerdings kann der dargestellte Ausbauprozess mittels ATP ausschließlich während der AZTMP-Platzierung in der N-Position stattfinden. Nach erfolgter Translokation des AZTMPs in die P-Position ist eine Verknüpfung zwischen dem AZTMP und ATP und damit der Ausbau nicht mehr möglich (vgl. Abb. 7Cb) (Sarafianos *et al.*, 2002). Während HIV-2 AZTTP ausschließlich beim Einbau diskriminiert, kann HIV-1 in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster um das aktive Zentrum der Polymerasedomäne beide Resistenzmechanismen, (Diskriminierung und Ausbau) gegenüber AZT nutzen (Boyer *et al.*, 2006; Boyer *et al.*, 2012).

### 1.8.1 Der Ausbau von AZTMP im HIV-1

Für den ATP-katalysierten AZTMP-Ausbau sind die fünf Substitutionen M41L, K70R, D67N, K219E/Q und T215Y/F in der resistenten HIV-1 RT verantwortlich (Abb. 8A). Studien zu den Resistenzsubstitutionen zeigten, dass K70R und T215Y/F den größten Betrag zur Resistenz liefern, während die anderen Substitutionen diesen Effekt nur verstärken (Meyer *et al.*, 1999; Boyer *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 1998; Larder *et al.*, 1989; Kellam *et al.*, 1992). Da die Substitution T215Y/F stets zur Ausbildung des Resistenzmusters für den AZTMP-Ausbau führt, wird sie in der medizinischen Diagnostik stets mit AZT-Resistenz assoziiert. Die Ursache für die Schlüsselrolle von Substitution T215Y/F wird in Abb. 8A anhand der Struktur der AZT-resistenten HIV-1 RT (RT<sub>AZT</sub>), sowie dem Ausbauprodukt AZT-P<sub>4</sub>-A, verdeutlicht. Hier ist die Positionierung des Ausbauprodukts AZT-P<sub>4</sub>-A in der HIV-1-RT-WT (RT<sub>wt</sub>) und der RT<sub>AZT</sub>, bis auf den AMP-Teil des ATPs deckungsgleich. Im WT kommt es zu einer AMP-Bindung in der Bindungsstelle I (*site I*) wo das AZTMP nicht ausgebaut werden kann. Im Gegensatz hierzu schafft die aromatische Substitution T215Y/F in HIV-1 RT<sub>AZT</sub> eine hochaffine Bindungsstelle II (*site II*) für den Adenosinring des ATPs (vgl. Abb. 8A).



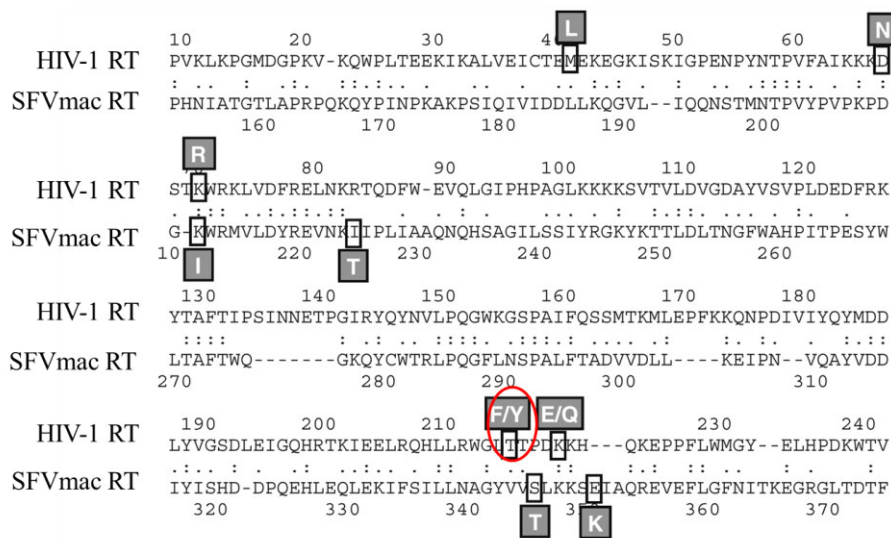
**Abb. 8:** (A) Ausschnitt der HIV-1 RT mit Substitutionen für den AZTMP-Ausbau und dem Ausbauprodukt AZT-P<sub>4</sub>-A. Zu sehen ist ein Ausschnitt der Polymerasedomäne in der p66 Untereinheit der HIV-1 RT. Die Handflächensubdomäne ist hellgrün, das aktive Zentrum gelb und die Fingersubdomäne hellblau hinterlegt. Die Substitutionen für den AZTMP-Ausbau sind rot hervorgehoben. Der grau angefärbte ATP-Teil des Ausbauprodukts AZT-P<sub>4</sub>-A (AZTMP in violett) ist im Wildtyp (WT) in der Bindungsstelle I (*site I*) lokalisiert, während er sich in der AZT-resistenten RT in *site II* (blau) befindet. Hydrophobe  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen zwischen Y215 und dem Adenosin in *site II* sind durch unterbrochene Linien angedeutet. (B) Überlagerung von *site I, II* und einem dNTP in der Nukleotidbindungstasche. Alle Phosphate des dNTPs und ATPs sind mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  ausgehend von Ribosering gekennzeichnet. Die Beschriftung der Phosphate wurde in der Farbe des dazugehörigen Nukleotids vorgenommen. Bindungspositionen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphate des ATPs in *site I* (grau) und *II* (blau) sind deckungsgleich. Sie binden innerhalb der Nukleotidbindungstasche an den  $\gamma$ - und  $\beta$ -Phosphatpositionen eines dNTPs (pink). Die Abbildungen wurden mittels PyMOL (A) durch Überlagerung der RT Strukturen aus den PDB Dateien 3KLE und 3KLF bzw. (B) 3KLE, 3KLF mit 3KK2 erstellt.

Hydrophobe  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Phenylring des Y215 und dem Adenosinring im ATP könnten das AMP in *site II* stabilisieren (Tu *et al.*, 2010). Abgesehen vom AMP-Teil des ATPs binden die beiden Phosphatgruppen ( $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat) des ATPs in *site I* und *site II* deckungsgleich zu den entsprechenden Phosphatgruppen eines dNTPs (Abb. 8B). Da das AZTTP beim Einbau genau wie ein dNTP in der Nukleotidbindungstasche der Polymerasedomäne positioniert ist, werden auch hier  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphate als PPi freigesetzt. Diese PPi Gruppe ist bindungsidentisch mit den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphaten von ATP, weshalb ATP in der Ausbaureaktion als PPi-Donor fungiert (in Abb. 8B). Damit wird deutlich, dass der AZTMP-Ausbau im Grunde eine rückwärts ablaufende Einbaureaktion von AZTMP ist.

Unklar bleibt jedoch wie die ATP-Bindung in *site I* oder *site II*, trotz deckungsgleicher  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphatpositionen, über den Ausbauprozess entscheiden kann. RTs aus anderen Retroviren, welche ebenfalls diesen Resistenzmechanismus aufweisen, können zur Aufklärung dieser Fragestellung beitragen. Interessanterweise konnte auch mit der RT aus SFVmac der Ausbaumechanismus von AZTMP in Gegenwart von ATP beobachtet werden (Abb. 7C) (Hartl *et al.*, 2008). Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit die SFVmac RT als Modellprotein zur Untersuchung der molekularen Abläufe im Ausbaumechanismus herangezogen werden.

## 1.8.2 Der Resistenzmechanismus gegen AZT im SFVmac

Obwohl SFVmac und HIV-1 den gleichen Resistenzmechanismus gegen AZT nutzen, sind in den beiden Retroviren für die Resistenz verschiedene Substitutionen in der PR-RT verantwortlich. Um einen maximalen AZT-Ausbau mit der SFVmac PR-RT zu erreichen, werden die vier Substitutionen K211I, I224T, S345T, und E350K benötigt (Hartl *et al.*, 2008; Kretzschmar *et al.*, 2008), während in der HIV-1 RT eine maximale Resistenz erst durch die fünf Substitutionen M41L, D67N, K70R, T215Y/F und K219E/Q erreicht wird (Larder *et al.*, 1989; Kellam *et al.*, 1992; Kellam *et al.*, 1994). Vergleicht man die für die Resistenz relevanten Sequenzbereiche beider RTs, so wird deutlich, dass trotz unterschiedlicher Aminosäureaustausche die Substitutionspositionen in den Aminosäuresequenzen beider resistenter RTs ähnlich sind (Abb. 9).



**Abb. 9: Sequenzvergleich relevanter Regionen der HIV-1 und SFVmac RT.** Substitutionen die zur AZT-Resistenz führen, sind in grauen Kästen über bzw. unter den ursprünglichen Aminosäuren positioniert. Die Substitution an Position 215 im HIV-1 ist rot eingekreist. Die Sequenzhomologie auf Aminosäureebene zwischen beiden RTs beträgt 21 % (verändert nach (Hartl *et al.*, 2008)).

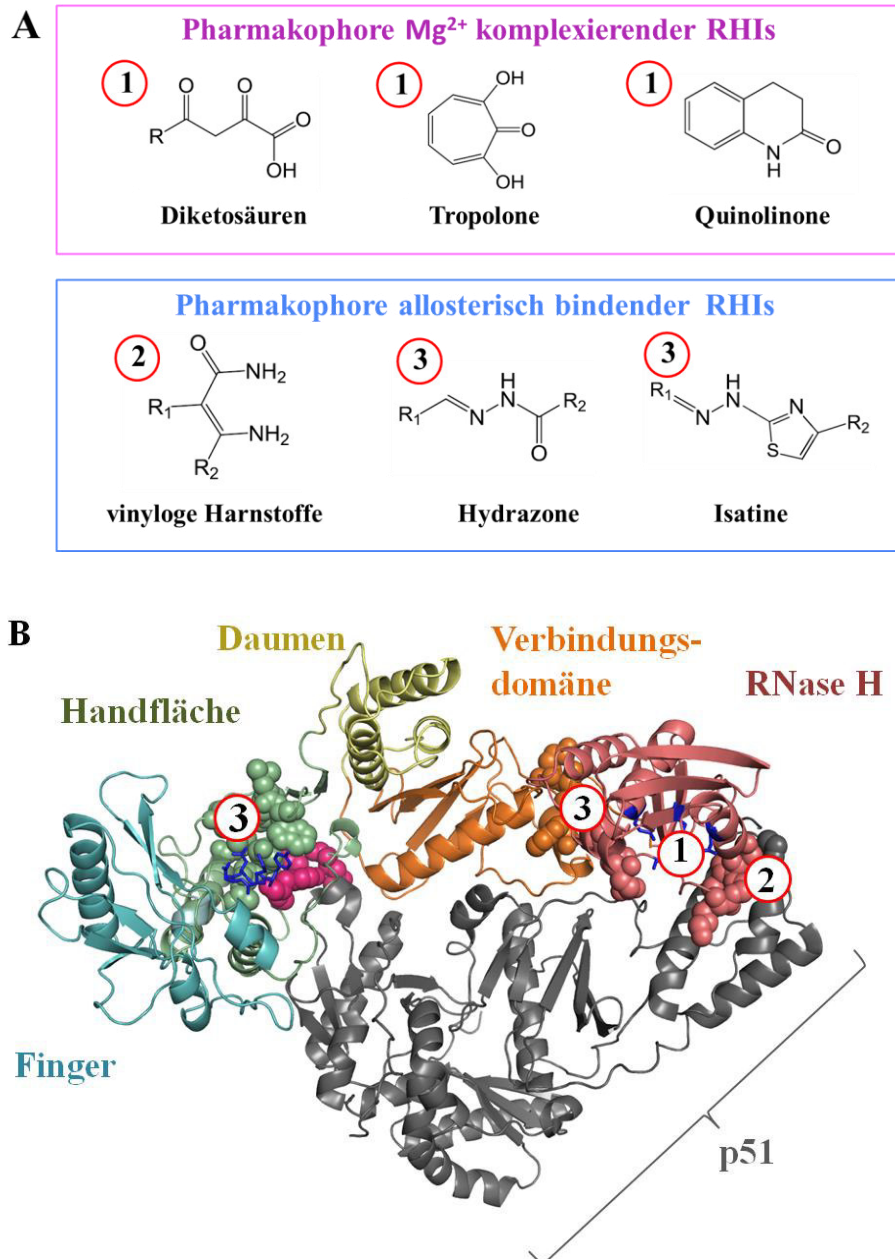
Ein essentieller Unterschied betrifft die Schlüsselsubstitution für den AZT-Ausbau in der HIV-1 RT, nämlich den Aminosäureaustausch T215Y/F (rot eingekreist in Abb. 9). In der AZT-resistenten SFVmac RT ist keine aromatische Substitution zu finden. Auch der genaue molekular-strukturelle Ablauf des AZTMP-Ausbaus ist hier im Vergleich zur HIV-1 bisher nur wenig untersucht. Deshalb ist unklar, inwiefern die SFVmac RT für den AZT-Ausbaumechanismus einen aromatischen Aminosäurerest benötigt und welche Rolle die vier Resistenzsubstitutionen im Ausbauprozess spielen. Zumal sich die Resistenz vermittelnden Substitutionen in SFVmac und HIV-1 unterscheiden, werden offensichtlich auf unterschiedliche Weise ähnliche strukturelle und funktionelle Voraussetzungen für den ATP-vermittelten Ausbau geschaffen. Folglich sind nicht die Substitutionen an sich, sondern ihr Einfluss auf Struktur und Katalyse einer RT der Schlüssel zum molekularen Verständnis der Resistenz. Untersuchungen zur

Wirkung einzelner Substitutionen in der SFVmac RT auf die enzymatische Funktionsweise der Polymerase könnten helfen, solche allgemeinen Resistenzvoraussetzungen zu definieren. Darüber hinaus könnten speziesübergreifende Vergleiche von SFVmac und HIV-1 auch Informationen zur Entstehung von Resistenzen über unterschiedliche Evolutionspfade liefern.

## 1.9 Die Inhibitoren der RNase H

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erwähnt, spielt das Enzym RT eine Schlüsselrolle im retroviralen Replikationszyklus. Da die RT neben der Polymerase auch über eine Ribonuklease H-Aktivität verfügt, ist die RNase H ein weiteres vielversprechendes Zielprotein für die Entwicklung neuer antiretroviraler Medikamente. Dank neuer Hochdurchsatz-Musterungsmethoden von Substanzen in Molekülbibliotheken konnten in den letzten zehn Jahren zahlreiche chemische Verbindungen auf ihre Wirkung als RNase H Inhibitoren (RHIs) getestet werden (zusammengefasst in (Beilhartz und Götte, 2010; Esposito *et al.*, 2012; Tramontano und Di Santo, 2010; Tramontano, 2006)). Innerhalb der wirksamen Verbindungen haben sich zwei Klassen an RHIs herauskristallisiert. Hierzu gehören einerseits Inhibitoren, die in der Nähe des aktiven Zentrums der RNase H binden und hier mit den beiden  $Mg^{2+}$  Ionen komplexieren ( $Mg^{2+}$  komplexierende RHIs) und andererseits RHIs mit Bindungstaschen außerhalb des aktiven Zentrums der RNase H, welche als allosterische RHIs bezeichnet werden. Für beide RHI-Klassen existiert mittlerweile eine Fülle an chemisch modifizierten Derivaten, welche auf wenigen Pharmakophoren basieren (zusammengefasst in (Ilina *et al.*, 2012)). Als Pharmakophor bezeichnet man denjenigen Teil eines Medikaments, welcher für die pharmazeutische Wirkung verantwortlich ist. Bei Inhibitoren sind Pharmakophore häufig funktionelle Gruppen, welche für die inhibierende Interaktion mit dem Zielprotein essentiell sind (Klebe, 2009). Sie dienen oft als Grundgerüst für die Synthese von weiteren Derivaten, mit der Zielsetzung die Wirkung des Inhibitors durch chemische Modifikationen zu optimieren. Einige wichtige Pharmakophore, mit  $Mg^{2+}$  komplexierender Wirkung im aktiven Zentrum der RNase H, sind in Abb. 10A dargestellt. Hierzu gehören die Diketosäuren (z. B. RDS1643) (Tramontano *et al.*, 2005; Kirschberg *et al.*, 2009), die Tropolone (z. B.  $\beta$ -Thujaplicinol und Manicol) (Chung *et al.*, 2011), sowie die Quinolinone (z. B. DHQ) (Billamboz *et al.*, 2011). Auffallend sind die Kombinationen aus Keto- und Hydroxylgruppen in allen Vertretern dieser Klasse. Untersuchungen mittels Kristallographie haben hier eine  $Mg^{2+}$  komplexierende Funktion dieser Gruppen bestätigt (Himmel *et al.*, 2009; Lansdon *et al.*, 2011). Einer der ersten Inhibitoren in dieser Klasse war das Diketosäurederivat RDS1643. Da die IN im aktiven Zentrum ebenfalls zwei  $Mg^{2+}$  Ionen koordiniert, wurden Diketosäuren ursprünglich als Inhibitoren für die IN entwickelt (Shaw-Reid *et al.*, 2003). Später konnte ihre inhibitorische Wirkung auf die RNase H nicht nur *in vitro*, sondern auch in Zellkultur bestätigt werden (Tramontano *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang konnten Diketosäurederivate als duale HIV-Inhibitoren mit zwei Angriffspunkten in

retroviralen Lebenszyklus, nämlich der Reversen Transkription und der Integration retroviraler DNA in das Wirtsgenom, fungieren.



**Abb. 10:** (A) Chemische Strukturen einiger wichtiger Pharmakophore aus der Klasse  $Mg^{2+}$  komplexierender und allosterischer RHIs. Die Nummerierungen geben die Bindungspositionen der Inhibitoren in der RT an (abgewandelt nach (Iliina *et al.*, 2012)). (B) Bindungspositionen von RHIs innerhalb des HIV-1 RT Heterodimers. Katalytische Reste in den aktiven Zentren sind in der Stäbchen-Darstellung in dunkelblau zu sehen. Die NNRTI Bindungstasche ist in der Polymerasedomäne pink hervorgehoben. Aminosäurereste, welche die Bindungstaschen für RHIs ausbilden sind in der Schleifenstruktur der RT als Kugeln in der Farbe der jeweiligen RT-Domäne zu sehen und entsprechend dem bindenden Inhibitor aus (A) nummeriert. RHIs mit mehreren potentiellen Bindungsstellen tragen dieselbe Nummerierung. Inhibitoren der  $Mg^{2+}$  komplexierenden Klasse (mit ① gekennzeichnet) binden alle in der Nähe des aktiven Zentrums der RNase H. Für vinylloge Harnstoffe wurde die Bindung an Position ② und für Hydrazone oder Isatine zwei Bindungsbereiche (mit ③ markiert) vorgeschlagen. Die Abbildung wurde mit PyMOL und den PDB Dateien 3KLE und 3LP1 erstellt.

Eine weitere wichtige Klasse der RHIs sind allosterisch in der HIV-1 RT bindende Verbindungen, welche neben der RNase H- auch die Polymeraseaktivität hemmen können. Hierzu gehören unter anderen die vinylogenen Harnstoffderivate (Chung *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2012), sowie die Hydrazone (Himmel *et al.*, 2006) und die hierzu strukturverwandten Isatinderivate (Distinto *et al.*, 2013) (vgl. Abb 10A). Mutationsstudien belegen, dass Derivate des vinylogenen Harnstoffs in einer hydrophoben Tasche innerhalb der Grenzfläche zwischen der RNase H Domäne und der p51 Untereinheit der HIV-1 RT binden und auf diese Weise die Aktivität der RNase H negativ beeinflussen (Abb. 10B 2) (Chung *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2012). Während die Bindung von Isatinderivaten bisher nur wenig untersucht ist, wurden für Hydrazone zwei potentielle Bindungspositionen bestimmt. Mit Hilfe der Kristallographie konnte eine Bindungstasche des Hydrazonderivates DHBNH in der Polymerasedomäne der RT, zwischen den Resten des aktiven Zentrums und der NNRTI Bindungstasche, identifiziert werden (Himmel *et al.*, 2006). Weitere Studien zur Hydrazonbindung konnten einen zweiten Bindungsort zwischen der RNase H- und der Verbindungssubdomäne, welcher in der Kristallstruktur unentdeckt geblieben ist, ermitteln (Felts *et al.*, 2011). Welche der beiden Taschen letztendlich für den inhibitorischen Effekt auf die RNase H verantwortlich ist konnte jedoch bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Da viele RHIs zytotoxisch sind und eine limitierte Aufnahme in Zellen aufweisen, ist es ein wichtiges Ziel der antiretroviralen Forschung diese Effekte zu minimieren. Durch die Addition unterschiedlicher Substituenten können amphiphilere Derivate mit höherer Zellpermeabilität geschaffen werden. Weiterhin kann die Spezifität der Bindung in der retroviralen RNase H durch chemische Modifikationen am Pharmakophor verbessert und dadurch die Zelltoxizität verringert werden. Strukturaufklärungen der RNase H mit RHI-Derivaten der  $Mg^{2+}$  komplexierenden Klasse konnten zeigen, dass entsprechende Substitutionen am Inhibitor zusätzliche, spezifizierende Interaktionen mit Resten in der RNase H erzeugen und damit die Bindungsaffinität fördern können (Lansdon *et al.*, 2011). Besonders konservierte Reste um das aktive Zentrum der RNase H eignen sich gut als spezifizierende Interaktionspartner dieser Inhibitoriklasse. Dies könnte die Diskriminierung des Inhibitors durch humane RNasen fördern und damit die Toxizität von RHIs senken. Dennoch erfordert die Auswahl und Platzierung solcher spezifizierender Substitutionen im Pharmakophor genaue Kenntnisse über die Bindungsposition und molekulare Umgebung des Inhibitors im Enzym.

## 2 Ziele der Arbeit

Das Enzym RT nimmt eine Schlüsselrolle im retroviralen Replikationsprozess von HIV-1 ein und ist deshalb ein häufiges und vielversprechendes Angriffsziel zahlreicher antiretroviraler Medikamente, wie z. B. des Nukleosidanalogs AZT. Da in HIV-1 und SFVmac ein gemeinsamer Resistenzmechanismus gegen das AZT, basierend auf dem AZTMP-Ausbau mittels ATP, beobachtet wurde, stellt die SFVmac PR-RT ein interessantes Modellprotein für die Erforschung von AZT-Resistenzmechanismen bei Retroviren dar.

Ein wichtiger Schwerpunkt dieser Arbeit ist die biochemische und biophysikalische Analyse von SFVmac PR-RT-Deletionsvarianten bestehend aus unterschiedlichen Abschnittsbereichen des vollständigen Proteins. Mit Hilfe der Deletionsvarianten sollte nicht nur die Region zwischen der PR und RT untersucht, sondern auch mögliche Grenzen der Verbindungssubdomäne zur restlichen Polymerase bzw. zur RNase H ermittelt werden. Weiterhin sollten die Deletionsvarianten zur Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen der (Sub)-Domänen in der PR-RT beitragen. Kenntnisse über die Grenzen zwischen den (Sub)-Domänen sollten außerdem helfen ein verkürztes funktionelles RT-Derivat zu konstruieren, um damit den AZT-Resistenzmechanismus in SFVmac mittels der Kernspinresonanz (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR)-Spektroskopie untersuchen zu können.

In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass bei SFVmac die vier Substitutionen K211I, I224T, S345T und E350K in der PR-RT für den Ausbau von AZTMP in Gegenwart von ATP verantwortlich sind. Für ein besseres Verständnis der Funktion einzelner Substitutionen im Ausbauprozess sollten diese vier Substitutionen in unterschiedlichen PR-RT-Varianten auf ihre Polymeraseaktivität, DNA-Bindungsaffinität und die Ausbildung fehlerhafter Basenpaarungen in *in vitro* Experimenten untersucht werden. Da die Aufklärung des AZTMP-Ausbaus im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, wurden weiterhin AZTMP-Ausbauxperimente und ATP-Bindungsstudien mit SFVmac PR-RT Varianten durchgeführt.

Als Bestandteil der RT stellt die RNase H ein weiteres wichtiges Zielprotein für die Entwicklung neuer antiretroviraler Medikamente dar. Die hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen den RNase H Domänen aus HIV-1 und dem PFV ermöglicht die Nutzung der PFV RNase H als Modellprotein für Studien von neuen Inhibitoren der HIV-1 RNase H. Die Struktur der PFV RNase H konnte in unserer Arbeitsgruppe mittels der NMR-Spektroskopie bereits gelöst werden. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte die Bindung des Inhibitors RDS1643 an der PFV RNase H in NMR-Titrationsexperimenten analysiert und unter Verwendung der computergestützten Modellierung in der PFV RNase H mit Bezugnahme auf HIV rekonstruiert werden.



### 3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

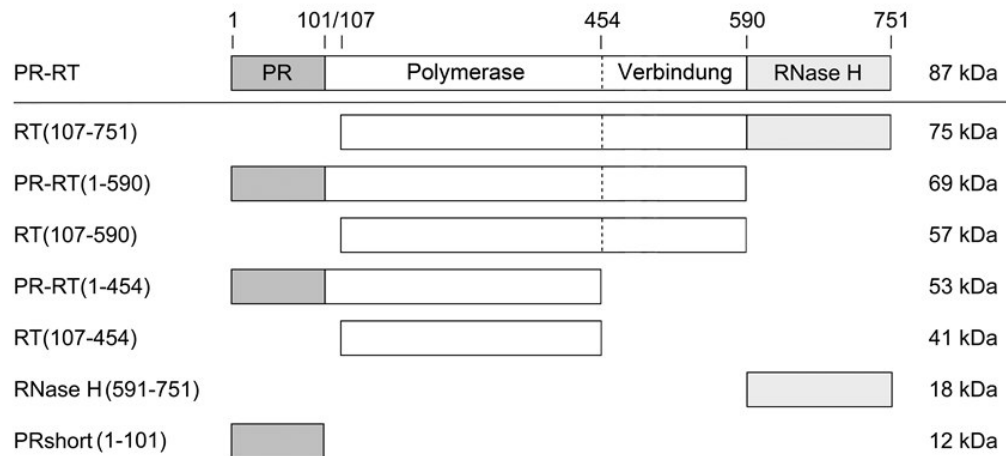
#### 3.1 Die Domänenorganisation von SFVmac PR-RT

Das Enzym RT ist die Schlüsselkomponente in jedem retroviralen Replikationszyklus. Neben heterodimeren RTs wie dem p66/p51 Heterodimer aus HIV-1 gibt es auch monomere RTs in zahlreichen Retroviren wie z. B. FVs, MoMLV oder XMRV. Analog zur katalytisch aktiven p66 Untereinheit im HIV-1 RT-Heterodimer besteht auch die monomere RT aus einer Polymerasedomäne, welche über die Verbindungssubdomäne mit der RNase H-Domäne verknüpft ist (Di Marzo Veronese *et al.*, 1986; Nowak *et al.*, 2013; Das und Georgiadis, 2004). Eine Besonderheit in der reifen, monomeren SFVmac PR-RT betrifft die zusätzliche PR-Domäne. Diese wird nicht abgespalten und stellt damit eine zusätzliche Domäne im funktionellen PR-RT Fusionsprotein dar. Obgleich die Sekundärstrukturen der beiden isolierten Domänen PR und RNase H in der PR-RT mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gelöst werden konnten (Hartl *et al.*, 2008; Leo *et al.*, 2012b), ist die Struktur der Polymerasedomäne bis heute nicht bekannt. Jedoch besonders bei fehlenden Strukturinformationen können ungenaue oder fehlende Kenntnisse über Domänen- und Subdomänengrenzen innerhalb der PR-RT die Planung und Interpretation von *in vitro* und *in vivo* Experimenten erschweren oder sogar verfälschen. Neben Veränderungen der natürlichen Tertiärstruktur einer Domäne können fehlerhafte Grenzen auch zu Aktivitäts- oder Löslichkeitsabnahmen in isolierten Domänen führen. Um mögliche Domänen- und Subdomänengrenzen innerhalb der PR-RT biochemisch zu bestimmen, wurden unterschiedliche N- und C-terminale Deletionsvarianten mit ausgewählten Abschnitten des gesamten Fusionsproteins PR-RT konstruiert und in *in vitro* Experimenten auf ihre katalytische Aktivität untersucht (Einzelarbeit A). Bei der Wahl zwischen mehreren möglichen Domänengrenzen innerhalb der PR-RT wurde die Löslichkeit und Zunahme an katalytischer Aktivität als positives Entscheidungskriterium herangezogen, wobei die Verkürzung einer Domäne, welche mit Aktivitätsverlusten verbunden war, abgelehnt wurde.

##### 3.1.1 Bestimmung der (Sub)-Domänengrenzen in der SFVmac PR-RT

Die bereits publizierten Informationen zu den isolierten Domänen PR und RNase H (Hartl *et al.*, 2008; Hartl *et al.*, 2010; Leo *et al.*, 2012a; Leo *et al.*, 2012b) wurden bei der Auswahl der PR-RT Deletionsvarianten PRshort(1-101) und RNase H(591-751) berücksichtigt (vgl. Abb. 11). Des Weiteren wurde der Übergangsbereich der Polymerase zur PR bzw. RNase H und die N-terminale Abgrenzung der Verbindungssubdomäne innerhalb der Polymerase analysiert. Hierbei legte man ein besonderes Augenmerk auf die Funktion der Region 102-143 zwischen PR- und Polymerasedomäne. Strukturelle und funktionelle Daten zur PR lieferten die Position 101 als das C-terminale Ende der PR, wobei in anderen Studien Aminosäure 144 als potentieller N-Terminus für die Polymerasedomäne vorgeschlagen wurde

(Pfrepper *et al.*, 1999; Hartl *et al.*, 2008). Deshalb wurde zuerst die Position 144 als N-terminaler Beginn der Polymerase getestet. Allerdings waren Varianten mit diesem Startpunkt (z.B. RT(144-751)) nur in sehr kleinen Mengen löslich und erwiesen sich als enzymatisch nicht aktiv. Folglich scheint die Region 102-143 nicht nur als flexible Verbindung zwischen den Domänen zu fungieren, sondern zumindest teilweise für die strukturelle und katalytische Integrität der Polymerase wichtig zu sein.



**Abb. 11: Schema zu den untersuchten SFVmac PR-RT Deletionsvarianten.** Das Fusionsprotein SFVmac PR-RT (87 kDa) lässt sich wie folgt unterteilen: N-terminale PR (PR; 1-101), RT bestehend aus der RNase H-Domäne (591-751) und der Polymerasedomäne mit der Verbindungssubdomäne (Verbindung; 455-590) und den restlichen Subdomänen der Polymerase (Polymerase; 107-454). Die Grenzen zwischen den Domänen sind als durchgehende Linien und zwischen den Subdomänen als unterbrochene Linien angezeigt. Die Bezeichnungen der Deletionsvarianten sind links und dazugehörige molekulare Massen rechts angegeben. Die Nummerierungen im Schema entsprechen der letzten C-terminalen Aminosäure der jeweiligen (Sub-)Domäne (angewandt nach Einzelarbeit A, Abb. 1).

Aufgrund des stark hydrophoben Charakters und der damit verbundenen eingeschränkten Löslichkeit des Abschnitts 102-106 in der SFV PR-RT wurde dieser Bereich nicht weiter untersucht, weshalb als Nächstes Position 107 als potentieller N-Terminus der Polymerasedomäne geprüft wurde. Die Varianten RT(107-751) und RT(107-590) zeigten gute Löslichkeitseigenschaften. Deshalb wurde Position 107 in allen Deletionsvarianten als Startpunkt für die Polymerasedomäne festgelegt (vgl. Abb. 11). Als potentielle N-terminale Abgrenzungen der Verbindungssubdomäne zur restlichen Polymerase wurden die beiden Positionen 449 und 454 überprüft. Allerdings waren die Konstrukte PR-RT(1-449) und RT(107-449) nicht löslich. Anders verhielt es sich mit den RTs (1-454) und (107-454), welche in ausreichender Menge für die nachfolgenden Experimente gereinigt werden konnten. Die Eignung der ermittelten Grenzpositionen 107 und 454 wurde anschließend in ausgewählten Deletionsvarianten wie z.B. der RT(107-454) mittels Aktivitätstests verifiziert. Eine Gegenüberstellung der Deletionsvarianten in den enzymatischen Experimenten sollte außerdem Informationen über die Bedeutung der einzelnen (Sub-)Domäne für die Aktivität der gesamten PR-RT liefern.

### 3.1.2 Substratbindung und enzymatische Aktivität von PR-RT Deletionsvarianten

Das multifunktionale Enzym PR-RT vereint drei katalytische Aktivitäten in einem Enzym. Neben dem proteolytischen Peptidverdau durch die PR gehört hierzu die durch die RT katalysierte RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerisation und der Abbau von RNA. Eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung der katalytischen Aktivität von PR-RT Deletionsvarianten ist die Bindung des Primer/Matrizenstranges an diese Proteine. Deshalb wurde zuerst die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) für die Bindung der Deletionsvarianten an eine fluoreszenzmarkierten dsDNA untersucht (Einzelarbeit A, Tab. 1). Bei der Betrachtung der  $K_D$ -Werte wird deutlich, dass die PR weder direkten noch indirekten Einfluss auf die DNA-Bindungsaffinität der RT hat. Dies kann an den ähnlichen  $K_D$ -Werten zwischen 6 und 3 nM für die DNA-Bindung der PR-RT und RT erkannt werden (Einzelarbeit A, Tab. 1). Bei den anderen Proteinkonstrukten führte die Deletion der RNase H Domäne (PR-RT(1-590)) zu einem 9-fachen Affinitätsrückgang und das zusätzliche Entfernen der Verbindungssubdomäne in der PR-RT(1-454) zu einem etwa 36-fachen Affinitätsabfall im Vergleich zur vollständigen PR-RT. In Anbetracht dieser enormen Affinitätsabnahmen scheinen die Wechselwirkungen von RNase H und Verbindungssubdomäne zum Phosphatrückgrad der dsDNA für eine hoch-affine Substratbindung in der PR-RT essentiell zu sein. Obwohl die RNase H nur RNA im RNA/DNA-Hybrid schneidet, trägt sie auch zur Bindungsaffinität der dsDNA in der RT entscheidend bei, was z.B. während der Reversen Transkription für die Synthese der Plusstrang-DNA am DNA-Matrizenstrang von Vorteil ist. Insgesamt konnte jedoch in allen untersuchten Deletionsvarianten der PR-RT die Bindung von dsDNA nachgewiesen werden.

Als Nächstes wurden in *in vitro* Experimenten die RNase H- und Polymeraseaktivitäten der unterschiedlichen Deletionsvarianten miteinander verglichen. Bei der Betrachtung der RNase H-Aktivität wiesen PR-RT(1-751) und RT(107-751) neben nahezu identischen Schnittmustern auch vergleichbare Aktivitätswerte auf (Einzelarbeit A, Tabelle 1 und Abb. 2). Folglich hat die PR-Domäne auf die enzymatische Aktivität der RNase H-Domäne keinen Einfluss. Anders verhielt es sich mit der isolierten RNase H(591-751), welche trotz höherer Konzentration eine etwa 3000-fach niedrigere Aktivität im Vergleich zur PR-RT aufwies. Diese reduzierte RNase H-Aktivität ist auf das Fehlen von zusätzlichen Substratkontakten in der Polymerasedomäne und eine damit einhergehende niedrigere Substrataffinität in der RNase H(591-751) zurückzuführen (Leo *et al.*, 2012a). Für gewöhnlich bestimmt die Platzierung des RNA/DNA Hybrids in der Polymerasedomäne die Position des Schnitts in der RNase H. Dies erfolgt dann in einem Abstand von 17-19 Nukleotiden (-17 bis -19) zum aktiven Zentrum der Polymerase in dem das 3'-OH Ende des Primers lokalisiert ist (Leo *et al.*, 2012a; Leo *et al.*, 2012b). Im Schnittmuster der isolierten RNase H sind zusätzlich zu den genannten Schnitten (-17 bis -19) zahlreiche kürzere Schnittprodukte zu sehen. Hierbei scheinen ein oder mehrere RNase H-Moleküle gleichzeitig an unterschiedlichen Positionen des Substrats unspezifisch zu binden und hier zu schneiden.

Weiterhin wurden die Deletionsvarianten in quantitativen und qualitativen Polymerisationsexperimenten einander gegenübergestellt (Einzelarbeit A, Tab. 1; Abb. 3 und 4). Wie unter natürlichen Bedingungen der Reversen Transkription wurden hierbei unterschiedliche Substrate verwendet. Für den spezifischen Aktivitätstest (Einzelarbeit A, Tab. 1) wurde eine homopolymere RNA-Matrize und in Polymerisations- und Prozessivitätsanalysen (Einzelarbeit A, Abb. 3) heteropolymere DNA als Matrize herangezogen. In beiden Experimenten war das Fehlen der Verbindungssubdomäne in den Varianten RT(1-454) und RT(107-454) für den größten Effekt in Form eines drastischen Aktivitätsrückgangs ursächlich. Hierbei spiegelte sich die bereits aufgezeigte niedrige DNA-Bindungsaffinität in diesen Deletionsvarianten in einer etwa 2000-fach schlechteren spezifischen Aktivität verglichen mit der PR-RT wider. In qualitativen Analysen waren hier im Vergleich zu den anderen Deletionsvarianten erst bei höheren Konzentrationen und längeren Polymerisationszeiten Verlängerungsprodukte zu erkennen (Einzelarbeit A, Abb. 3A). Aber selbst unter diesen Bedingungen konnte hier die Aktivität der anderen Deletionsvarianten nicht erreicht werden. Im Vergleich zur PR-RT mit der höchsten Aktivität in allen Polymerisationsexperimenten führte interessanterweise die Deletion von RNase H (RT(1-590)) oder PR (RT(107-751)) zu einer Abnahme in der Polymeraseaktivität (Einzelarbeit A, Abb. 3A). Da der  $K_D$ -Wert für dsDNA mit und ohne PR unverändert blieb, ist nicht die Substratbindungsaffinität für den Aktivitätsverlust in der RT(107-751) im Vergleich zur PR-RT verantwortlich. Aus diesem Grund muss eine stabilisierende Wirkung der PR in der PR-RT, welche die strukturelle Integrität und damit indirekt die Polymerisationseigenschaften verbessert, angenommen werden. Die Aktivitätsverschlechterung basierend auf der RNase H-Deletion ist auf die bereits gezeigte Abnahme der Bindungsaffinität in der RT(1-590) zurückzuführen. Insgesamt konnte jedoch keine Deletionsvariante eine mit der PR-RT vergleichbar hohe Aktivität erreichen. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass jede C- oder N-terminale Deletion die Polymerisationseigenschaften des Proteins über die Abnahme der Substratbindungsaffinität oder eine Destabilisierung der Struktur negativ beeinflusst.

Die prozessive Polymerisation beschreibt die Fähigkeit einer DNA-Polymerase nach einmaliger Substratbindung ohne Dissoziation und erneute Reassoziierung lange Produkte während einer Polymerisationsrunde zu bilden. Ein Vergleich der Prozessivitätseigenschaften aller Varianten bestätigte die bereits im Polymerisationsexperiment beobachteten Unterschiede zwischen der PR-RT und ihren Deletionsvarianten (vgl. Einzelarbeit A, Abb. 3B). Auffällig waren hier die Abbruchreaktionen nach dem Einbau der ersten beiden Nukleotide. Selbst bei der PR-RT waren etwa 50 % aller Reaktionsabbrüche in diesem Bereich angesiedelt. Diese Beobachtung lässt auf Schwierigkeiten während der Polymerisationsinitiation schließen.

Zur detaillierteren Betrachtung der Polymerisationsinitiation wurde ein kürzeres DNA-Substrat mit der Möglichkeit bis zu 20 Nukleotide einzubauen herangezogen. Unter diesen Bedingungen zeigten schwach

aktive RT-Varianten ohne die Verbindungssubdomäne keine Polymerisationsprodukte (Einzelarbeit A, Abb. 4). Obgleich die PR-RT und die anderen Deletionsvarianten Verlängerungsprodukte aufwiesen, waren hier zahlreiche Abbrüche nach 4 bzw. 9 Einbaureaktionen zu verzeichnen. Alle Verlängerungen über diesen Bereich hinaus führten jedoch ohne weitere Reaktionsstopps zu vollständig verlängerten Produkten. Da in den durchgeführten Experimenten (Einzelarbeit A, Abb. 3 und 4) DNA-Substrate mit vollkommen unterschiedlichen Sequenzen verwendet wurden, traten die Polymerisationsabbrüche sequenzunabhängig auf. Möglich wären Probleme bei der Konformationsänderung nach dem Einbau der ersten Nukleotide. Diese Konformationsänderung stellt den Übergang zwischen der Initiations- und der prozessiveren Elongationsphase dar. Ein einmal erfolgter Übergang würde dann in weniger Abbrüchen und damit einer höheren Prozessivität im fortschreitenden Elongationsprozess resultieren.

### 3.1.3 NMR-spektroskopische Untersuchungen von PR-RT Deletionsvarianten

Obgleich beide Varianten RT(107-590) und RT(107-454) zur Polymerisation fähig waren, zeigten sie im Vergleich zur PR-RT deutlich weniger Aktivität (Einzelarbeit A, Tab. 1). Zusätzlich konnte hier der größte beobachtete Aktivitätsverlust durch eine Deletion der Verbindungssubdomäne in der RT(107-454) erzielt werden. Um diesem Aktivitätsrückgang auf den Grund zu gehen, wurde mittels der NMR-Spektroskopie die strukturelle Integrität und thermische Stabilität der beiden kleinsten RT-Varianten näher betrachtet. Die beiden  $^{15}\text{N}$  isotopenmarkierten RTs (107-590) und (107-454) zeigten in  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC (*heteronuclear single quantum correlation*)-NMR-Spektren eine deutliche Signaldispersion in beiden Dimensionen, was auf gefaltete Proteine mit regulären Tertiärstrukturelementen schließen lässt (Einzelarbeit A, Abb. 5A/B).

Die Stabilität eines Enzyms ist eine wichtige Voraussetzung für dessen enzymatische Aktivität. Um die thermische Stabilität der beiden Deletionsvarianten (RT(107-590) und RT(107-454)) zu untersuchen, wurden eindimensionale  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren im Temperaturbereich zwischen 15 °C und 40 °C für beide Proteine in 5 °C Schritten aufgenommen (Einzelarbeit A, Abb. 5C/D). In einem solchen Spektrum ist die Signalabnahme auf thermische Entfaltung bzw. irreversible Aggregation zurückzuführen. Während die Polymerasedomäne mit Verbindungssubdomäne (RT(107-590)) bei 40 °C entfaltete, war die Deletion der Subdomäne für eine Entfaltung der RT(107-454) bereits bei 35 °C verantwortlich. Da alle Polymerisationsexperimente bei der physiologischen Temperatur von 37 °C vorgenommen wurden, könnte die niedrige thermische Stabilität der RT(107-454) bei 35 °C die Aktivitätsabnahmen hier zumindest teilweise erklären.

Diese Analysen zeigten, dass die Verbindungssubdomäne nicht nur eine Verbindung zwischen der Polymerase- und der RNase H-Domäne darstellt, sondern die Stabilität und Aktivität der Polymerasedomäne beeinflusst. Zudem wurde deutlich, dass die N-terminale Region 107-143 der

Polymerasedomäne für ihre strukturelle Integrität und Funktionalität essentiell ist. Denkbar ist hier auch eine Rückfaltung der Aminosäuren 107-143 in Richtung der Polymerasedomäne, wie dies bereits für den N-terminalen Abschnitt der XMRV RT beobachtet wurde (Nowak *et al.*, 2013). In diesem Fall könnte die Region 107-143 auch die PR-Aktivität beeinflussen.

### **3.1.4 Die Aktivierung der PR bei Deletionsvarianten**

Untersuchungen zur katalytischen Aktivitäten der PR-RT (Sub)-Domänen schlossen auch die Analyse der PR-Aktivität mit ein. Hierbei sollte geklärt werden, welche Bereiche der RT die Dimerisierung und damit Aktivierung der PR beeinflussen. Grundsätzlich kann die PR-Dimerisierung auf zwei Arten erzielt werden: entweder artifiziell in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (2-3 M NaCl), oder auf natürliche Weise durch die Bindung von mindestens zwei PR-RT-Molekülen an die PARM-Sequenz innerhalb der genomischen RNA (Hartl *et al.*, 2011). Beide Aktivierungsmöglichkeiten wurden mit der PR-RT und den Deletionsvarianten, welche eine PR-Domäne enthalten, betrachtet. Unter Hochsalzbedingungen konnte in allen Konstrukten die PR aktiviert werden. Jedoch in Gegenwart von PARM ließen die Deletionsvarianten PR-RT ohne RNase H (1-591), PR-RT ohne RNase H und Verbindungssubdomäne (1-454) oder PR ohne RT (PRshort) keine Aktivierung der PR zu. Neben einem positiven Beitrag zur strukturellen Integrität der RT verbessern Verbindungssubdomäne und RNase H die Bindungsaffinität enorm gegenüber Nukleinsäuren. Somit könnten zusätzliche, affinitätserhöhende Wechselwirkungen dieser (Sub)-Domänen mit PARM, die PARM-Bindung und damit PR-Aktivierung fördern. Hierbei kann auch die Stabilisierung einer möglicherweise günstigen RT-Konformation für die PARM-Bindung nicht ausgeschlossen werden.

### **3.1.5 Einflüsse der PR auf die Reverse Transkription**

Das aktive PR-Homodimer erkennt *in vivo* zwei Schnittstellen. Diese sind in den Vorläuferproteinen Gag p71 (zwischen p68 und p3) und Pol (zwischen PR-RT und IN) positioniert (Pfrepper *et al.*, 1999; Pfrepper *et al.*, 1998). Folglich kann im Pol-Vorläuferprotein neben der PR-RT auch die IN angetroffen werden, welche jedoch die proteolytische Aktivität der PR nicht zu beeinflussen scheint (Spannaus *et al.*, 2012). Während die PR sämtliche Pol-Moleküle schneidet, ist der Schnitt in den Gag-Vorläuferproteinen nur unvollständig (Cartellieri *et al.*, 2005b). Trotzdem konnte wiederholt gezeigt werden, dass gerade der Schnitt im Gag-Protein für die virale Infektiosität und Replikation des FV absolut notwendig ist (Enssle *et al.*, 1997; Zemba *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 1998; Hütter *et al.*, 2013). Replikation und Infektiosität sind wiederum von einer erfolgreichen Synthese des viralen Genoms abhängig. Untersuchungen zur Reversen Transkription konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der Spaltung von Gag und der cDNA-Synthese aufzeigen (Enssle *et al.*, 1997). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit (Einzelarbeit B) der Schnitt im Gag-Vorläuferprotein als potentieller

Regulationsmechanismus für die Reverse Transkription untersucht. Während das p68 Gag-Protein ohne Prozessierungsmöglichkeit nur wenig Einfluss auf die virale Infektiosität hatte, resultierte nicht prozessierbares p71 Gag ohne die p3 Schnittstelle in nicht infektiösen Viruspartikeln (Einzelarbeit B). Deshalb wurde eine mögliche hemmende Wirkung des p71 bzw. dessen Spaltprodukts p3 auf die cDNA-Synthese näher betrachtet. Zumal kein Unterschied in der Polymerisationsreaktion der PR-RT in An- bzw. Abwesenheit von p3 zu erkennen war, scheint das isolierte p3-Peptid keinen Einfluss auf die Reverse Transkription zu haben. Im Gegensatz hierzu konnte in Gegenwart von nicht prozessiertem p71 eine Inhibition des ersten Strangtransfers bei der cDNA-Synthese beobachtet werden (Einzelarbeit B, Abb. 2). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Abspaltung von p3 im Gag p71 Vorläuferprotein als Regulationselement während der Reversen Transkription dient und hiermit die zeitlichen Abläufe während der viralen Reifung gesteuert werden. Im viralen Reifungsprozess muss nämlich sichergestellt werden, dass die Prozessierung von Gag und Pol vor der Reversen Transkription stattfindet, denn bei der Reversen Transkription wird PARM während der cDNA Synthese durch die RNase H abgebaut. Da nach dem Abbau von PARM die PR nicht mehr aktiviert werden kann, könnte die proteolytische Spaltung von Gag und Pol dann nicht mehr stattfinden. In diesem Fall würde die IN nicht mehr freigesetzt werden, um für den Integrationsprozess aktive IN-Tetramere auszubilden und das Virus wäre damit nicht mehr überlebensfähig. Durch den dargestellten Kontrollpunkt der p3-Abspaltung wird wahrscheinlich die zeitliche Abfolge von proteolytischen Spaltungsprozessen und der anschließenden Reversen Transkription sichergestellt.

## 3.2 Die AZT-Resistenz im Modellprotein SFVmac PR-RT

Im Rahmen der Behandlung von HIV-1-Infektionen werden auch heute noch, neben Inhibitoren der PR und IN vor allem NRTIs und NNRTIs eingesetzt. Der erste und noch immer einer der wichtigsten RT-Inhibitoren ist das Thymidinanalogon AZT (St Clair *et al.*, 1987; Mitsuya *et al.*, 1985). Da die HIV-1 RT keine Korrekturlesefunktion besitzt, können sich schnell Resistenzmutationen gegen Inhibitoren wie das AZT entwickeln. Ein Resistenzmechanismus im HIV-1 basiert auf dem ATP-katalysierten Ausbau von eingebautem AZTMP in Form des Dinukleotids AZT-P<sub>4</sub>-A (Meyer *et al.*, 1999; Boyer *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 1998). Interessanterweise konnte im SFVmac ein ähnlicher Resistenzmechanismus gegen das AZT beobachtet werden (Hartl *et al.*, 2008). Um die allgemeinen strukturellen und katalytischen Voraussetzungen des AZTMP-Ausbaumechanismus an einer RT besser zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die AZT-Resistenz der SFVmac PR-RT biochemisch untersucht und mit der AZT-resistenten HIV-1 RT verglichen.

### 3.2.1 Die Varianten von SFVmac PR-RT

In früheren Publikationen konnte bereits gezeigt werden, dass in der SFVmac PR-RT die vier Aminosäureaustausche K211I, I224T, S345T, und E350K für die maximale AZT-Resistenz benötigt werden (Hartl *et al.*, 2008; Kretzschmar *et al.*, 2008). Weiterhin konnte in Zellkulturexperimenten mit Viren, die einige dieser Substitutionen enthielten, eine Beeinträchtigung der viralen Fitness dokumentiert werden (Kretzschmar *et al.*, 2008). Welche weiteren Auswirkungen die Resistenzsubstitutionen auf die katalytischen Abläufe der SFVmac PR-RT haben bzw. inwiefern diese Veränderungen den AZTMP-Ausbau begünstigen, soll im Folgenden thematisiert werden. Um die Wirkung jeder einzelnen Substitution (K211I, I224T, S345T, E350K) genauer analysieren zu können, wurden unterschiedliche PR-RT Varianten mit ausgewählten Kombinationen der vier Substitutionen untersucht (zusammengefasst in Abb. 12). In früheren Publikationen wurde bereits gezeigt, dass die PR-RT Variante *mt3* (K211I, S345T, E350K) und die hoch resistente PR-RT *mt4* sehr ähnliche AZTMP-Ausbaueigenschaften besitzen (Hartl *et al.*, 2008). Folglich handelt es sich bei dem Aminosäureaustausch I224T um einen Polymorphismus, der zwar keinen Einfluss auf die Resistenz hat, aber *in vivo* eine positive Wirkung auf die virale Replikation ausübt (Hartl *et al.*, 2008; Kretzschmar *et al.*, 2008). Zur Klärung der Funktion der drei anderen Substitutionen im Ausbauprozess, wurden PR-RT-Varianten mit jeweils einer der vier Substitutionen, sowie mit Kombinationen aus jeweils zwei der drei Substitutionen K211I, S345T, E350K (*mt2a-c*) kloniert und gereinigt (Abb. 12). In anschließenden *in vitro* Experimenten wurden diese Varianten zusammen mit der WT-PR-RT ohne Substitutionen, sowie den AZT-resistenten PR-RTs *mt3* und *mt4* biochemisch und biophysikalisch charakterisiert und miteinander verglichen.



		Substitution			
		K211I	I224T	S345T	E350K
PR-RT Variante	WT				
	K211I				
	I224T				
	S345T				
	E350K				
	<i>mt2a</i>				
	<i>mt2b</i>				
	<i>mt2c</i>				
	<i>mt3</i>				
	<i>mt4</i>				

**Abb. 12: Substitutionen von untersuchten SFVmac PR-RT-Varianten.** Neben dem WT ohne Substitutionen wurden neun weitere Varianten der PR-RT mit unterschiedlichen Kombinationen der vier Aminosäureaustausche gereinigt und ihre biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften charakterisiert (abgewandelt nach Einzelarbeit C, Abb. 2A).

### 3.2.2 Die katalytische Aktivität und der AZTMP-Ausbau

Betrachtet man die AZTMP-Ausbaureaktionen der vier Varianten mit jeweils einem Aminosäureaustausch K211I, I224T, S345T und E350K, so wird deutlich, dass nur S345T allein zum ATP-vermittelten Ausbau fähig ist (Einzelarbeit C, Tab. 1, Abb. 2C). Kommt nun eine weitere Substitution wie K211I (*mt2a*) oder E350K (*mt2c*) hinzu, so wird die Ausbaufähigkeit von S345T jeweils verbessert. Ein bemerkenswerter Anstieg in der Resistenz wird aber erst in Anwesenheit aller drei Substitutionen (S345T, E350K, K211I) mit der *mt3* erreicht. Da der zusätzliche Polymorphismus in der hochresistenten *mt4* keinen Beitrag zur Resistenz leistet, wurde hier im Vergleich zur *mt3* keine weitere Resistenzsteigerung erzielt. Diese Beobachtungen konnten in Zellkulturen mit Viren, deren PR-RTs die Substitutionskombinationen aus Abb. 12 enthielten (vgl. Einzelarbeit C, Tab. 1) mit einer Abweichung für Variante *mt2a* (K211I, S345T), bestätigt werden (Kretzschmar *et al.*, 2008). Auch hier wurde die Bedeutung von S345T deutlich, da sie als Einzige, ohne weitere Substitutionen, AZT-Resistenz zeigte. Obwohl die Variante *mt2a* die wichtigste Substitution für den Ausbau (nämlich S345T) enthielt, waren Viren mit dieser Substitutionskombination in Gegenwart von AZT nicht überlebensfähig. Aber auch in Abwesenheit von AZT konnten sich diese Viren nicht replizieren. Folglich war *in vivo* nicht die fehlende Resistenz gegen das AZT, sondern die schlechte Replikation von *mt2a* für den niedrigen viralen Titer ursächlich. Dies verdeutlicht, wie wichtig die virale Replikationsfähigkeit als Kontrolle für die Beurteilung der AZT-Resistenz ist.

Zusätzlich zu den *in vitro* AZTMP-Ausbauxperimenten wurden die spezifischen Polymeraseaktivitäten der untersuchten PR-RT-Varianten mit einer homopolymeren RNA als Matrize bestimmt. Die im Virus

nicht lebensfähige Substitutionskombination der *mt2a* zeigte *in vitro* basale Aktivität. Dies lässt vermuten, dass in Zellkultur nicht nur die Polymerisationsreaktion als solche, sondern andere spezifische Abläufe in der Replikation, wie der Strangtransfer gestört sein müssen und das Virus sich deshalb nicht replizieren kann.

Die spezifischen Polymeraseaktivitäten für K211I und die anderen Varianten (*mt2a* und *mt2b*) mit dieser Substitution ließen im Vergleich zum WT signifikante Abnahmen erkennen (Einzelarbeit C, Tab. 1). Dieser Aktivitätsverlust konnte erst mit der *mt4* mittels der zusätzlichen Substitutionen zumindest teilweise ausgeglichen werden, wodurch eine dem WT ähnliche Aktivität erreicht wurde. In Zellkultur war dieser Effekt ebenfalls zu beobachten und erst der Polymorphismus I224T konnte den viralen Titer im hochresistenten Virus (mit allen vier Substitutionen) auf WT-Niveau anheben (Einzelarbeit C, Tab. 1). Da im *in vitro* Experiment in Gegenwart von E350K eine signifikante Verbesserung der Polymerisationseigenschaften im Vergleich zum WT zu verzeichnen war, könnte diese Substitution zusätzlich zu I224T die Aktivitätsverluste durch K211I ausgleichen.

Um die Ursachen für den Aktivitätsrückgang durch die Substitution K211I zu verstehen, wurden die Polymerisationseigenschaften von PR-RT Varianten näher untersucht.

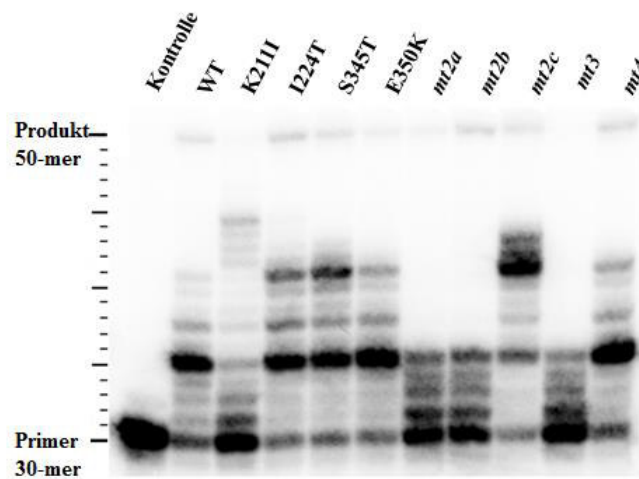
### 3.2.3 Substratbindung und Nukleotideinbau von den PR-RT Varianten

Während der Polymerisation wird ein Nukleinsäuresubstrat bestehend aus Primer und Matrize in der Bindungsfurche der RT gebunden. Im Anschluss werden dNTPs in der Nukleotidbindungstasche positioniert und in den naszierenden Primerstrang eingebaut. Zur Klärung der Aktivitätsabnahme bei Varianten mit K211I wurde sowohl die Bindungsaffinität gegenüber der Primer/Matrize als auch der Einbau von dNTPs in den PR-RT-Varianten betrachtet. Anhand der Änderung in der Anisotropie während Fluoreszenzgleichgewichtstitrationen wurden die  $K_D$ -Werte für die DNA-Bindung aller PR-RTs bestimmt (Einzelarbeit C, Tab. 2). Die  $K_D$ -Werte der PR-RT-Varianten waren sehr ähnlich und bewegten sich im Bereich zwischen 10 und 20 nM. Folglich können Unterschiede in der DNA-Bindungsaffinität als Ursache für die Aktivitätsabnahme durch K211I ausgeschlossen werden.

Zusätzlich wurde die Michaeliskonstante ( $K_M$ ) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) für den Einbau von dTMPs mit den PR-RT Varianten betrachtet. K211I und die Varianten *mt2a* und *mt2b*, die ebenfalls K211 enthielten, zeigten hierbei eine deutlich niedrigere katalytische Effizienz im Vergleich zur WT-PR-RT (Einzelarbeit C, Tab. 2). Ursächlich hierfür waren, neben niedrigeren  $v_{max}$ -Werten auch sehr hohe  $K_M$ -Werte. Die hohen  $K_M$ -Werte mit K211I und den Varianten *mt2a* und *mt2b* weisen auf eine niedrigere Bindungsaffinität für dTTP hin (Einzelarbeit C, Tab. 2). Im Gegensatz dazu konnte die

katalytische Effizienz der WT-PR-RT durch E350K bei den Varianten E350K und *mt2c* (S345T, E350K) deutlich verbessert werden.

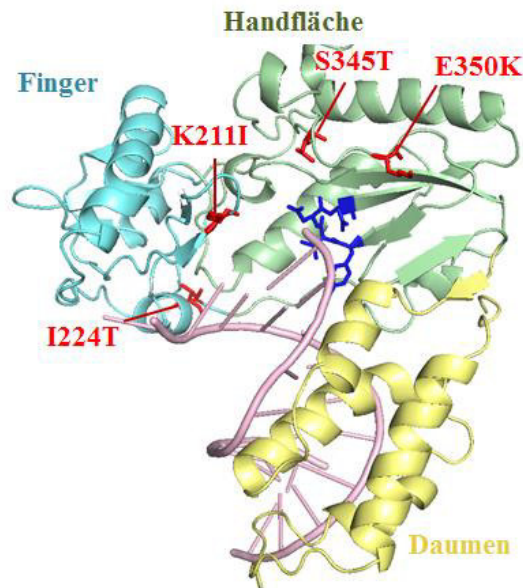
Auch die Betrachtung der Polymerisationsinitiation, welche den Einbau der ersten Nukleotide zeigt, ließ für die Variante *mt2c* bessere Polymerisationseigenschaften im Verhältnis zu allen übrigen PR-RTs erkennen (vgl. Abb. 13). Erneut hatten Varianten, die K211I enthielten und eine verminderte spezifische Aktivität aufwiesen Schwierigkeiten die Polymerisation zu initiieren. Dies wurde in verstärkten Abbruchreaktionen innerhalb der ersten vier Einbauereignisse sichtbar. WT und *mt4* zeigten allerdings sehr ähnliche Initiationseigenschaften, was wiederum auf Kompensationen des Aktivitätsverlustes durch K211I hinweist. Die PR-RT Variante I224T zeigte keine signifikante Verbesserung in der Polymeraseaktivität und wirkt sich hauptsächlich auf das Überleben des Virus in Zellkultur positiv aus.



**Abb. 13: Polymerisationsinitiation an dsDNA mittels der untersuchten SFVmac PR-RT-Varianten.** Gezeigt sind die Verlängerungsprodukte eines am 5'-Ende mit  $^{32}\text{P}$  markierten 30-mer DNA-Primers mit SFVmac WT und den Varianten. Durch die Verwendung einer 50-mer DNA-Matrize konnten Verlängerungsprodukte mit Längen von bis zu 50 Nukleotiden detektiert werden. Die Kontrolle enthielt keine PR-RT (Einzelarbeit C, Abb. 2B).

In der HIV-1 RT können Aminosäuren in der basischen Schleifenregion der Fingersubdomäne ( $\beta 3$ - $\beta 4$ ), die Polymeraseaktivität beeinflussen indem sie mit den Phosphaten einzubauender dNTPs interagieren (Sarafianos *et al.*, 1995; Garforth *et al.*, 2007). Die Aminosäure K211 in der SFVmac RT könnte in einer ähnlichen basischen Schleife positioniert sein. Um diese Vermutung zu überprüfen, sind jedoch strukturelle Daten zur AZT-resistenten SFVmac RT *mt4* erforderlich. Zumal die Struktur der SFVmac Polymerasedomäne bisher nicht gelöst werden konnte, wurde basierend auf der Kristallstruktur der XMRV RT mit einem RNA/DNA Hybrid ein Modell des N-terminalen Bereichs in der SFVmac RT *mt4* erstellt (Abb. 14). Damit konnten die vier Resistenzsubstitutionen den einzelnen Subdomänen der SFVmac Polymerasedomäne zugeordnet werden. Zwei Substitutionen (S345T und E350K) befinden sich in der Handfläche der RT in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum und damit dem eingebauten AZTMP

am 3'-Ende des Primers. Der Polymorphismus I224T ist auf der vom aktiven Zentrum abgewandten Seite der Fingersubdomäne in einiger Entfernung zu den anderen Substitutionen lokalisiert. K211I ist ebenfalls in der Fingersubdomäne in einer Schleifenregion anzutreffen. Diese Schleife ist homolog zur  $\beta$ 3- $\beta$ 4-Schleifenregion in der HIV-1 RT. In früheren Veröffentlichungen zur HIV-1 RT haben Aminosäureaustausche in dieser Schleifenregion neben Veränderungen der Polymeraseaktivität und der NRTI-Resistenz auch die Einbaugenauigkeit von Nukleotiden beeinflusst (Das *et al.*, 2009; Garforth *et al.*, 2010). Da K211I in einer homologen Schleife positioniert ist, wurde die Einbaugenauigkeit von Nukleotiden mit den SFVmac PR-RT Varianten ebenfalls analysiert.



**Abb. 14: Lokalisation der Substitutionen in SFVmac RT *mt4*.** Unter Zuhilfenahme der Programme SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006) und PyMOL wurde ein Modell der AZT-resistenten Polymerasedomäne von *mt4* ohne Verbindungssubdomäne erstellt. Dieses basiert auf der Struktur der XMRV RT (PDB: 4HKQ) mit einem RNA/DNA Substrat. Die vier Substitutionen, sind rot hervorgehoben. Das aktive Zentrum der Polymerase mit dem YVDD Aminosäuremotiv ist dunkelblau und das RNA/DNA Hybrid rosa angefarbt (Einzelarbeit C, Abb. 1).

### 3.2.4 Einbaugenauigkeit von Nukleotiden und RNase H-Aktivität

Im Verhältnis zum WT konnte mit den Varianten K211I, *mt2a* und *mt2b* eine höhere Einbaugenauigkeit erzielt werden (Einzelarbeit C, Abb. 4). In ebendiesen Varianten wurde bereits eine verringerte Polymeraseaktivität festgestellt. Weiterhin zeigten Varianten mit guten Polymerisationseigenschaften, wie E350K eine niedrigere Einbaugenauigkeit als der WT. Eine solche umgekehrte Korrelation zwischen Polymeraseaktivität und Einbaugenauigkeit konnte bereits in der RT aus HIV-1 für die Substitutionen K65R und M184V/I geschlussfolgert werden (Garforth *et al.*, 2010; Boyer und Hughes, 1995; Oude *et al.*, 1997). Obgleich die Substitution K211I die AZT-Resistenz in den Varianten *mt3* und *mt4* deutlich verbesserte, konnte hier keine Verbesserung in der Einbaugenauigkeit nachgewiesen werden. Folglich ist

die erhöhte Einbaugenauigkeit nicht für die Resistenz an sich erforderlich, sondern vielmehr ein Folgeeffekt der aus den Resistenzbedingungen resultiert.

Substitutionen in der SFVmac PR-RT könnten den AZTMP-Ausbau auch indirekt über eine Beeinträchtigung der RNase H-Aktivität fördern. In der HIV-1 RT wird durch eine verringerte RNase H-Aktivität der Polymerasedomäne mehr Zeit für den AZTMP-Ausbau zur Verfügung gestellt, bevor die RNA abgebaut wird und das Substrat dissoziieren kann (Delviks-Frankenberry *et al.*, 2008; Delviks-Frankenberry *et al.*, 2007; Julias *et al.*, 2003). Deshalb wurde die RNase H-Aktivität der PR-RT-Varianten ebenfalls betrachtet (Einzelarbeit C, Abb. 3B). Abgesehen von Variante E350K zeigten sowohl Schnittmuster, als auch Schnitteffizienz der RNase H von Varianten keine signifikanten Unterschiede zum WT. Zumal die Substitution E350K bei gleichbleibenden Schnittpositionen einen Anstieg der Schnitteffizienz herbeiführte, konnte für SFV PR-RT *mt4* eine Resistenzverbesserung basierend auf einer Beeinträchtigung der RNase H-Aktivität ausgeschlossen werden. Um zu testen ob der unterschiedliche AZTMP-Ausbau in den Varianten auf Unterschieden in der ATP-Bindungsaffinität beruht, wurden NMR-spektroskopische ATP-Bindungsstudien vorgenommen.

### 3.2.5 ATP Bindungsstudien mit Hilfe der NMR-Spektroskopie

Selbst die kleinste, untersuchte SFVmac Polymerasedomäne RT(107-454) führte im NMR-Spektrum zu einer enormen Dichte und Überlagerung von Signalen, verbunden mit inhomogenen Signalintensitätsabnahmen (vgl. Einzelarbeit A, Abb. 5A/B). Dies verhinderte die Strukturaufklärung und andere Experimente mittels der NMR-Spektroskopie. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wurde die SFVmac RT(107-454) weiter verkleinert. Entsprechend einem N-terminalen Fragment der Polymerasedomäne aus MoMLV (Georgiadis *et al.*, 1995; Najmudin *et al.*, 2000) wurde ein N-terminales, katalytisches Fragment der SFVmac RT, bestehend aus der Finger- und Handflächensubdomäne konstruiert. Dieses RT-Fragment (Aminosäuren 107-368) (RTshort-WT) enthielt neben dem vollständigen aktiven Zentrum auch die Bereiche für die AZT-Resistenzsubstitutionen und war damit für ATP-Bindungsstudien geeignet. Wie schon das N-terminale Fragment der MoMLV (Najmudin *et al.*, 2000), zeigte auch die SFVmac RTshort-WT zwar dsDNA-Bindungsaffinität, aber keine signifikante spezifische Polymeraseaktivität. Dies lässt sich durch das Fehlen der Fingersubdomäne, welche für den dNTP-Einbauprozess essentiell ist, erklären. Für die Untersuchung der ATP-Bindung sind jedoch die Resistenzsubstitutionen und eine hierdurch gebildete ATP-Bindungstasche wichtig.

Interaktionen zwischen der RT und dem ATP sollten mit Hilfe zweidimensionaler NMR-Experimente, der sogenannten  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren visualisiert werden. Grundsätzlich zeigen  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins die Korrelationen der Resonanzfrequenzen von Wasserstoff- und Stickstoffkernen, welche in Peptidbindungen direkt miteinander verbunden sind. Deshalb kann jedem

Signal im HSQC-Spektrum eine Peptidbindung im Proteinrückgrad und damit eine Aminosäure zugeordnet werden. Da in der dreidimensionalen Proteinstruktur jede Peptidbindung eine andere chemische Umgebung erfährt, kommt es zur Signaldispersion, was auch als chemische Verschiebung bezeichnet wird. Im Falle einer Ligandenbindung ändert sich die chemische Umgebung der betroffenen Peptidbindungen, was eine Änderung der chemischen Verschiebung zur Folge hat. Konkret würde die ATP-Bindung in der RTshort-WT eine solche Änderung der chemischen Verschiebung, in Form einer Signaländerung im HSQC-Spektrum bewirken. Zur Analyse der ATP-Bindungseigenschaften im WT, sowie der hochresistenten *mt4* wurden HSQC-Spektren der entsprechenden RTshort-Konstrukte in Ab- und Anwesenheit von ATP aufgenommen (Einzelarbeit C, Abb. 5). Während mit der RTshort-WT selbst bei einem 58-fachen molaren Überschuss an ATP keine signifikanten Änderungen der Signalpositionen bzw. Signalintensitäten erkennbar waren (Einzelarbeit C, Abb. 5A), konnten für RTshort-*mt4* nach ATP-Zugabe chemische Verschiebungen und damit ATP-Bindung im HSQC-Spektrum beobachtet werden (Einzelarbeit C, Abb. 5B). Die verwendete ATP-Konzentration lag mit 21 mM weit über dem physiologischen Wert von 1-10 mM (Gavegnano *et al.*, 2012; Kennedy *et al.*, 1999).

Aus den Ausbauxperimenten mittels ATP ist ersichtlich, dass der Aminosäureaustausch S345T allein für die AZTMP-Ausbaureaktion ausreichend ist (Einzelarbeit C, Abb. 2C und Tab. 1). Da für den Ausbauprozess die ATP-Bindung notwendig ist, sollte der Austausch S345T die Bindung von ATP im Vergleich zum WT fördern. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde der Aminosäurerest T345 in der resistenten RTshort-*mt4* zur wildtypischen Aminosäure S345 rückmutiert (RTshort-*mt4*-T345S) und HSQC-Spektren mit der RTshort-*mt4*-T345S in Abwesenheit von ATP sowie einem 59-fachen ATP-Überschuss aufgenommen. Ähnlich wie beim WT konnte mit diesem Protein keine Signalverschiebung und damit keine ATP-Bindung festgestellt werden (Einzelarbeit C, Abb. 5C). Diese Ergebnisse zeigen, dass S345T den Ausbau von AZTMP ermöglicht, indem es die Ausbildung einer ATP-Bindungstasche in der SFVmac PR-RT bewirkt.

### 3.2.6 Kinetische Parameter des AZTMP-Ausbaus

Unklar bleibt welche Bedeutung die beiden anderen Substitutionen K211I und E350K für den Ausbau haben. Zur Klärung dieser Frage wurden mit PR-RT Varianten AZTMP-Ausbaureaktionen bei steigenden ATP-Konzentrationen durchgeführt und daraus die kinetischen Parameter  $K_M$  und  $v_{max}$  bestimmt (Einzelarbeit C, Tab. 3). Alle untersuchten RTs erreichten bei Substratsättigung ähnliche maximale Ausbaugeschwindigkeiten, was für einen gemeinsamen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt spricht. Die Substitutionen K211I oder E350K konnten den  $K_M$ -Wert von S345T in den Varianten *mt2a* (K211I, S345T) und *mt2b* (S345T; E350K) nicht signifikant verbessern. Wurden aber alle drei Substitutionen miteinander kombiniert (*mt3*), so konnte ein ähnlicher  $K_M$ -Wert wie in *mt4* bestimmt werden. Damit

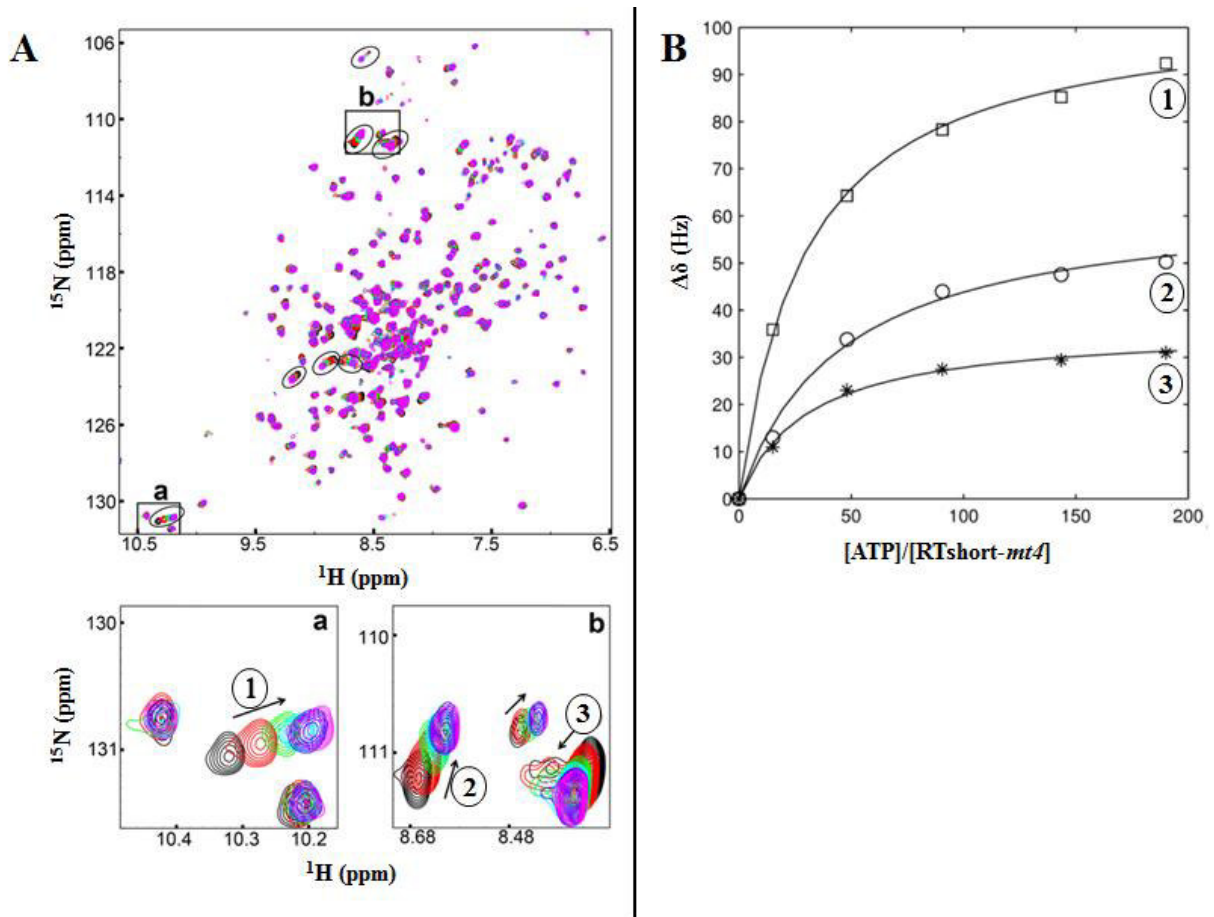
erreicht S345T nur zusammen mit beiden Substitutionen K211I und E350K in der *mt3* maximalen AZTMP-Ausbau. Hierbei könnte K211I den AZTMP-Ausbau fördern indem es, aufgrund einer verringerten Affinität gegenüber Nukleotiden, das Dissoziieren des Ausbauprodukts (AZT-P<sub>4</sub>-A) im Ausbauprozess begünstigt. In der *mt3* können die negativen Effekte auf die Polymeraseaktivität durch K211I in Gegenwart von E350K zumindest teilweise kompensiert werden.

### 3.2.7 Die ATP-Bindungsaffinität an der RTshort-*mt4*

Ferner wurde die Änderung der chemischen Verschiebung in NMR-Spektren zur Bestimmung der ATP-Bindungsaffinität an der hochresistenten RTshort-*mt4* Variante herangezogen. Zur Verbesserung der spektralen Qualität wurde ein sogenanntes TROSY (*transverse relaxation optimized spectroscopy*)-<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum (Pervushin, 2000) verwendet. Ein solches HSQC-Spektrum der RTshort-*mt4* wurde nach jedem Titrationsschritt mit ATP aufgenommen. Legt man die Spektren mit steigenden ATP-Konzentrationen übereinander, so sind für einige Signale der RTshort-*mt4* Änderungen in der chemischen Verschiebung zu erkennen (Abb. 15A).

Sieben signifikante Signalverschiebungen (in Abb. 15A eingekreist) wurden für die Bestimmung des K<sub>D</sub>-Wertes der ATP-Bindung ausgewählt. Für die Auswertung wurden die Änderungen in der chemischen Verschiebung als gewichtete Mittelwerte (von <sup>1</sup>H- und <sup>15</sup>N- Verschiebungen) gegen den Quotienten [ATP]/[RTshort-*mt4*] aufgetragen. Mit Hilfe einer Gleichung die ein Zweizustandsmodell beschreibt, wurde eine Kurve an die Datenpunkte angeglichen, was in Abb. 15B für einige Signale aus Abb. 15A (a, b) exemplarisch gezeigt ist. Der gemittelte K<sub>D</sub>-Wert aus sieben Signalverschiebungen betrug  $7,6 \pm 2,4$  mM und bewegte sich im Bereich typischer ATP-Konzentrationen in Zellen (Gavegnano *et al.*, 2012; Kennedy *et al.*, 1999).

Für gewöhnlich sind die <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-Resonanzsignale von Indolgruppen aus Tryptophanen im Bereich 9,5 bis 10,5 ppm eines HSQC-Spektrums anzutreffen (Cavanagh *et al.*, 2007; Wishart *et al.*, 1991). Obgleich die Signale im HSQC-Spektrum den Aminosäuren in der RTshort-*mt4* nicht zugeordnet werden konnten, war es möglich die Signale im Bereich 9 bis 10,5 ppm auf Tryptophanreste einzugrenzen. Wie in Abb. 15A (a) zu sehen, ist ein Tryptophan an der ATP-Bindung in der RTshort-*mt4* beteiligt. Die signifikanten Änderungen in der chemischen Umgebung des Tryptophans lassen einen direkten Kontakt mit dem ATP in Form von  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen, vermuten. Auch in der AZT-resistenten HIV-1 RT wurden  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen des ATPs mit dem Aromaten Y/F215 nachgewiesen (Tu *et al.*, 2010). Allerdings handelt es sich bei Y/F215 um eine der Resistenzsubstitutionen, welche das ATP in der für den Ausbau günstigen Position *site II* stabilisiert (vgl. Kap. 1.8.1 und Abb. 8A). Das betroffene Tryptophan in der SFVmac RT ist auch im WT vorhanden, wobei erst die Substitution S345T eine Interaktion mit dem ATP ermöglicht.



**Abb. 15:** (A) Titration der RTshort-*mt4* mit ATP. Überlagerung der TROSY  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von RTshort-*mt4* für Titrationschritte mit ATP. Die Spektren wurden entsprechend dem Quotienten  $[\text{ATP}]/[\text{RTshort-}mt4]$  angefärbt. Die Quotienten in den schwarz, rot, grün, türkis, blau und rosa kolorierten Spektren betragen 0, 15, 48, 92, 142 und 195. Vergrößerungen der beiden spektralen Ausschnitte (a) und (b) zeigen beispielhaft einige der Signalverschiebungen aus dem Gesamtspektrum. (B) Bestimmung des  $K_D$ -Wertes für ATP. Der gemittelte  $K_D$ -Wert von  $7,6 \pm 2,4$  mM wurde aus den sieben in (A) eingekreisten Signalverschiebungen bestimmt. Beispielhaft sind die Sättigungskurven für die Signale ①, ② und ③ in A (a) und (b) gezeigt (Einzelarbeit C, Abb. 6).

Insgesamt befinden sich sieben Tryptophane in der SFVmac RTshort, wovon zwei zum hydrophoben Kern der Fingersubdomäne gehören (Einzelarbeit C, Abb. 6A). Ein Tryptophan (W258) ist in der katalytischen Furche der RT in der Handflächensubdomäne lokalisiert. Sowohl zum katalytischen Zentrum als auch zum wichtigsten Rest für die ATP-Bindung (T345) weist W258 die kleinste Distanz auf. Durch den Aminosäureaustausch S345T könnte W258 seine Position oder Orientierung in der RT ändern und dadurch stabilisierende  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen mit ATP ausbilden.

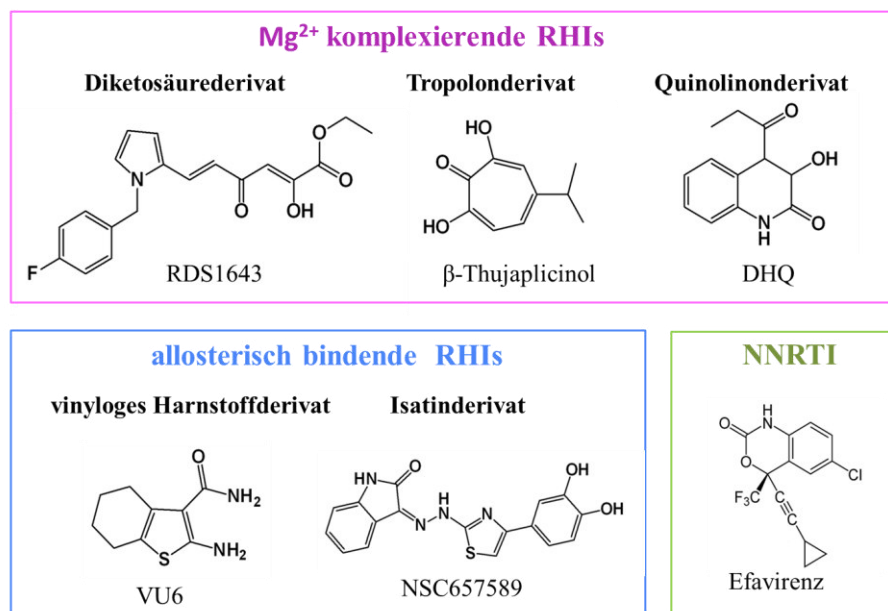


### 3.3 Studien zur Inhibition der PFV RNase H mit HIV-1 RNase H Inhibitoren

#### 3.3.1 Wirkung von HIV-1 Inhibitoren auf die PFV RNase H

Alle retroviralen RTs verfügen neben der Polymerasedomäne über eine C-terminale RNase H-Domäne. Während der Reversen Transkription von Retroviren baut die RNase H die RNA-Matrize ab und ist damit für die Synthese der Plusstrang DNA unerlässlich. In Anbetracht dieser wichtigen Funktion der RNase H ist dieses virale Protein ein vielversprechendes, neuartiges Zielprotein retroviraler Inhibitoren. Allerdings befinden sich die Inhibitoren der RNase H (RHIs) zurzeit noch in der präklinischen Phase und sind als Medikamente noch nicht zugelassen. Die Zelltoxizität von RHIs zu senken ist ein wichtiges Ziel präklinischer Studien. Dies kann durch eine höhere Spezifität der Bindung und Wirkung von RHIs erzielt werden. Allerdings erfordert die Modifikation von Leitsubstanzen zur Erhöhung der Bindungsaffinität und Wirkung genaue Kenntnisse über die Bindungsposition und chemische Umgebung des Inhibitors im Zielprotein (Lansdon *et al.*, 2011; Corona *et al.*, 2014). Strukturelle Informationen zur Bindungstasche eines Inhibitors können mittels Kristallographie oder NMR-Spektroskopie gewonnen werden. Obgleich einige Strukturen der HIV-1 RNase H im Komplex mit RHIs mit Hilfe der Kristallographie gelöst werden konnten (Himmel *et al.*, 2006; Himmel *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2010), ist die Anzahl dieser Strukturen begrenzt. Hier eröffnet die NMR-Spektroskopie vielversprechende Möglichkeiten Bindungen von RHIs in Zielproteinen zu studieren (Christen *et al.*, 2012). Die isolierte RNase H-Domäne aus HIV-1 ist nur als modifiziertes Konstrukt mit einer Schleifenregion aus *E. coli* unter hohen  $MgCl_2$ -Konzentrationen (20-80 mM) für NMR-Experimente nutzbar (Pari *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1994; Keck und Marqusee, 1995; Stahl *et al.*, 1994). Allerdings kann die Bindung von Inhibitoren der  $Mg^{2+}$  komplexierenden Klasse bei so hohen  $MgCl_2$  Mengen nicht mehr beobachtet werden.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die PFV RNase H als Modellprotein für Untersuchungen von HIV-1 RHIs herangezogen. Abgesehen von der hohen Strukturhomologie der PFV und HIV-1 RNase H bringt die Verwendung der PFV RNase H mehrere Vorteile mit sich: Zum einen ist diese ohne die Polymerasedomäne als isolierte Domäne ohne weitere Modifikationen aktiv und zum anderen können hier NMR Spektren einer stabilen RNase H-Domäne bei niedrigen  $MgCl_2$ -Konzentrationen von 6 mM aufgenommen werden (vgl. Einzelarbeit A, Abb. 2) (Leo *et al.*, 2012a; Leo *et al.*, 2012b). Um mit der PFV RNase H ein Modellsystem zur Untersuchung der HIV-1 RHIs zu etablieren, musste zuerst sichergestellt werden, dass die Inhibitoren auch gegen die gereinigte PFV PR-RT wirksam sind. Hierfür wurden in *in vitro* Experimenten unterschiedliche Vertreter der beiden Inhibitor Klassen in Abb. 16 hinsichtlich ihrer Wirkung auf die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität (*RNA-dependent DNA polymerase activity, RDDP*) und RNase H-Aktivität von PFV PR-RT in Form von  $IC_{50}$ -Werten (Inhibitorkonzentration, welche die jeweilige katalytische Aktivität des Enzyms auf die Hälfte reduziert) untersucht (Einzelarbeit D, Tab. 1).



**Abb. 16: Chemische Strukturen der untersuchten HIV-1 RT Inhibitoren:** Zu sehen sind die Strukturen der getesteten RHI-Derivate aus der Mg<sup>2+</sup> komplexierenden Klasse, sowie allosterisch bindende RHIs mit den dazugehörigen Pharmakophorklassen. Exemplarisch für NNRTIs wurde Efavirenz verwendet (verändert nach Einzelarbeit D, Abb. 1).

Aus der Klasse der Mg<sup>2+</sup>-komplexierenden Inhibitoren wurde das Diketonsäurederivat RDS1643 (Tramontano *et al.*, 2005), das Tropolonderivat β-Thujaplicinol (Chung *et al.*, 2011; Budihhas *et al.*, 2005) sowie das Quinolinonderivat DHQ (Suchaud *et al.*, 2012) getestet. Für die HIV-1 RT konnte eine selektive Bindung von Mg<sup>2+</sup>-komplexierenden Inhibitoren ausschließlich in der RNase H beobachtet werden (Himmel *et al.*, 2006; Himmel *et al.*, 2009; Lansdon *et al.*, 2011). Bei der PFV PR-RT hemmten die Inhibitoren RDS1643 und DHQ zusätzlich zur RNase H- auch die RDDP-Aktivität (Einzelarbeit D, Tab. 1). Allerdings waren die IC<sub>50</sub>-Werte von RDS1643 und DHQ für beide Aktivitäten der PFV PR-RT sehr ähnlich. Dies spricht für eine indirekte, inhibitorische Fernwirkung auf die Polymerasedomäne, wobei der Inhibitor nur an der RNase H bindet und von hieraus wirkt. Solche Effekte könnten auf Änderungen der RT-Flexibilität oder der Substratbindung in der PR-RT aus dem PFV basieren.

Aus der Klasse allosterisch bindender HIV-1 RHIs wurden das vinyloge Harnstoffderivat VU6 (Chung *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2012) und das Isatinderivat NSC657589 (Distinto *et al.*, 2012) geprüft. In Studien mit der HIV-1 RT beeinträchtigte NSC657589 sowohl die RNase H- als auch die RDDP-Aktivität wobei VU6 ausschließlich die RNase H Aktivität hemmte (Chung *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2012; Distinto *et al.*, 2012). Bezüglich des PFV verschlechterten beide Inhibitoren beide Aktivitäten der PR-RT (Einzelarbeit D, Tab. 1). Zwar könnte die zusätzliche Inhibition der PFV RDDP-Aktivität durch VU6 auf einer, von der RNase H ausgehenden Fernwirkung beruhen, allerdings kann ein weiterer Bindungsort des Inhibitors in der Polymerasedomäne des PFV nicht ausgeschlossen werden. Da der NNRTI Efavirenz keine

inhibitorischen Effekte auf die PFV PR-RT erkennen ließ (Einzelarbeit D, Tab. 1), ist davon auszugehen, dass eine NNRTI-Bindungstasche in der PFV PR-RT nicht vollständig vorhanden ist.

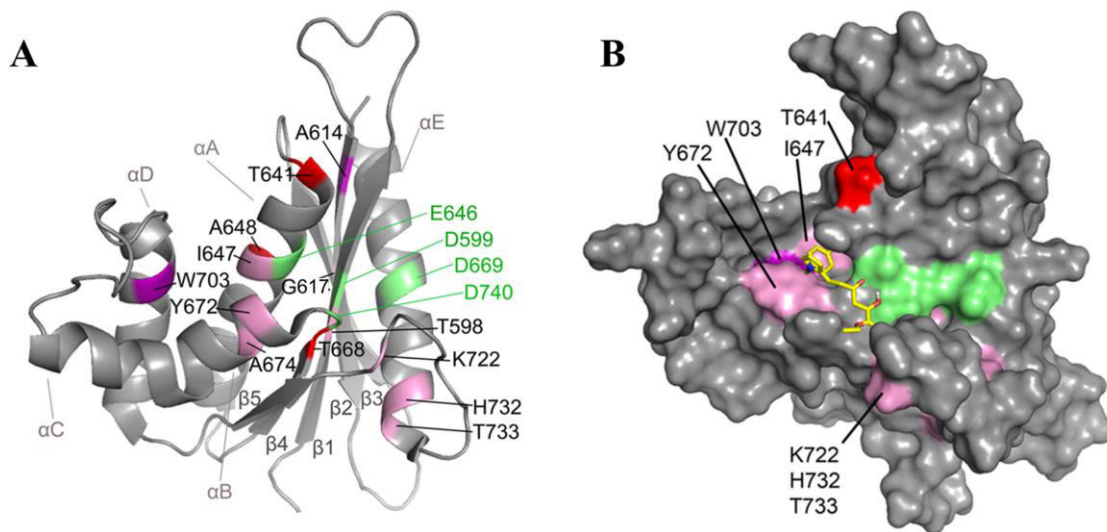
Unter Berücksichtigung der aufgeführten Ergebnisse konnten für die untersuchten  $Mg^{2+}$  komplexierenden RHIs ähnliche Bindungstaschen in den RNase H Domänen von HIV-1 und PFV angenommen werden. Zwar ist bekannt, dass das RDS1643 aufgrund dessen Komplexierung mit  $Mg^{2+}$  in der Nähe des aktiven Zentrums binden muss (Tramontano *et al.*, 2005; Shaw-Reid *et al.*, 2003), die genaue Bindungsposition in der HIV-1 RNase H konnte allerdings bisher nicht ermittelt werden. Aus diesem Grund sollte im Zuge der Etablierung eines Modellsystems für die Untersuchung von RHIs auch eine potentielle Bindungstasche für RDS1643 in der HIV-1 RNase H über dieses System bestimmt werden.

### 3.3.2 NMR-spektroskopische Studien der RDS1643 Bindung in der PFV RNase H

Die Position von RDS1643 in der PFV RNase H wurde mittels NMR-spektroskopischer Experimente mit der gereinigten RNase H Domäne, deren Struktur bereits mit Hilfe der NMR-Spektroskopie in unserer Arbeitsgruppe gelöst werden konnte, untersucht (Leo *et al.*, 2012a; Leo *et al.*, 2012b).  $^1H/^{15}N$ -HSQC-Spektren der  $^{15}N$  markierten PFV RNase H ließen für zahlreiche Aminosäurereste signifikante Signalverschiebungen während der Titration mit dem Inhibitor RDS1643 erkennen (Einzelarbeit D, Abb. 3A/B). Hierbei waren besonders die Aminosäurereste I647, A648, T598 und T668 in direkter Nachbarschaft zu den Resten des aktiven Zentrums (E646, D599, D669) betroffen (vgl. Abb. 17 A).

Eine Änderung in der chemischen Verschiebung eines  $^1H/^{15}N$ -Resonanzsignals basiert nicht nur auf unmittelbarem Kontakt der Peptidbindung mit dem Inhibitor, sondern kann auch durch mittelbare Effekte auf die chemische Umgebung von Aminosäuren verursacht werden. Solche mittelbaren Effekte betreffen meistens Aminosäuren, die sich im Inneren eines Proteins befinden und können indirekte Einschränkungen in der konformationalen Beweglichkeit darstellen. Bei den aufgeführten benachbarten Aminosäuren des aktiven Zentrums handelt es sich um solche Reste im Proteininneren, welche von der RDS1643-Bindung mittelbar über Interaktionen der Ketogruppen mit den  $Mg^{2+}$ -Ionen im aktiven Zentrum betroffen sind. Im Gegensatz hierzu zeigt die raumfüllende Struktur der RNase H in Abb. 17B ausschließlich auf der Oberfläche der RNase H exponierte Aminosäuren. Dazu gehören die vier Aminosäuren Y672, W703, I647 und T641, die sich in einer Kavität neben dem katalytischen Zentrum befinden und nach Inhibitorzugabe auffallend große Signalverschiebungen zeigten. In dieser hydrophoben Kavität könnte der aromatische Teil von RDS1643 durch  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen mit Y672 und W703 stabilisiert werden. Eine weitere Gruppe von Aminosäuren K722, H732 und T733 ist an der N-terminalen Schleife der RNase H positioniert und hat zumindest teilweise Zugang zur Proteinoberfläche. Die kleinen Änderungen in den chemischen Verschiebungen dieser Reste lassen jedoch auf wenige, schwache

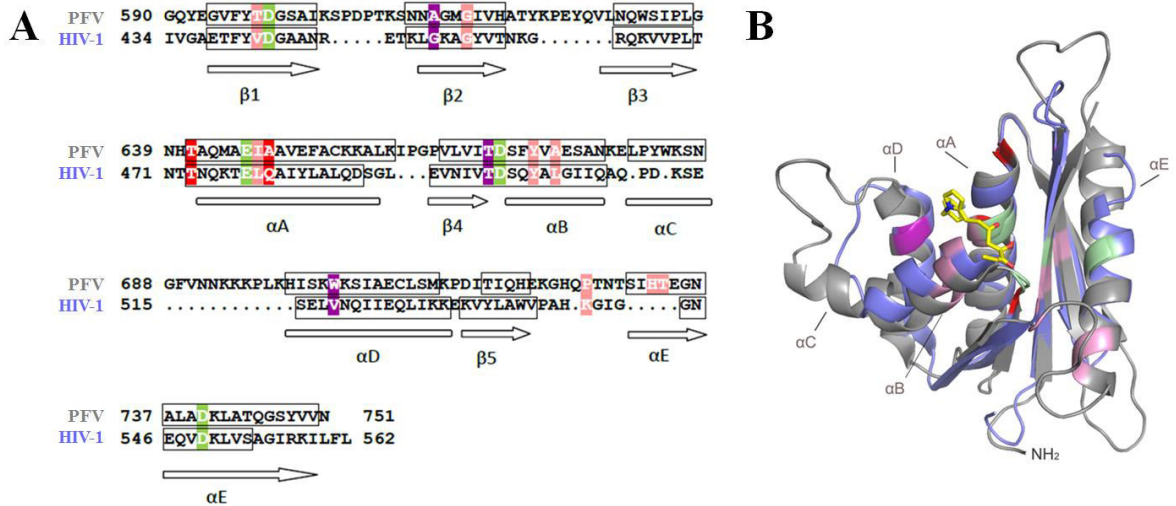
Interaktionen mit RDS1643 oder eine mittelbare Einflussnahme des Inhibitors auf die Struktur dieses Bereiches schließen.



**Abb. 17: Identifikation der potentiellen RDS1643 Bindungstasche in der PFV RNase H.** (A) Gezeigt ist das Bänderdiagramm der PFV RNase H (PDB Dateien: 2LSN) mit  $\alpha$ -Helices ( $\alpha A$  bis  $\alpha E$ ) und  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( $\beta 1$  bis  $\beta 5$ ). Die vier Aminosäuren des aktiven Zentrums sind grün angefärbt. Reste, deren Signale in den  $^1H/^{15}N$ -HSQC Spektren bei einer Endkonzentration von 3,9 mM RDS1643 signifikante Änderungen in der chemischen Verschiebung ( $\Delta_{norm}$ ) aufzeigten (als signifikant wurde ein  $\Delta_{norm}$ -Wert  $\geq 0,02$  ppm angesehen) sind beschriftet und farbig markiert:  $\Delta_{norm} \geq 0,02$  ppm ist pink;  $\Delta_{norm} \geq 0,03$  ppm ist violett,  $\Delta_{norm} \geq 0,04$  ppm ist rot. (B) Raumfüllende Struktur der RNase H mit Farbkodierung aus (A). Der Inhibitor RDS1643 wurde mittels *in silico* Modellierung unter Verwendung des Programms AutoDock Vina (Trott und Olson, 2010) platziert (verändert nach Einzelarbeit D, Abb. 4).

Weiterhin wurde unter Verwendung des Programms AutoDock Vina (Trott und Olson, 2010) eine computergestützte Modellierung der RDS1643-Bindung in der RNase H des PFV vorgenommen (Abb. 17B). Entsprechend den Ergebnissen aus den NMR-Experimenten wurde hierbei der potentielle Bindungsbereich von RDS1643 auf die Region um das aktive Zentrum, einschließlich der hydrophoben Kavität seitlich davon, eingegrenzt. Das Modell der PFV RNase H mit RDS1643 in Abb. 17B zeigte gute Übereinstimmung mit den NMR-Daten. Der Inhibitor befindet sich in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum und könnte hier die  $Mg^{2+}$ -Ionen des aktiven Zentrums komplexieren. Diese RDS1643-Bindung lässt außerdem die prognostizierten hydrophoben Interaktionen mit den aromatischen Resten Y672 und W703 in der RNase H zu.

Um eine potentielle Bindungstasche für das RDS1643 in der HIV-1 RNase H zu identifizieren, wurden die gewonnenen Informationen zur RDS1643-Bindung mit der PFV RNase H herangezogen. Sowohl ein Vergleich der Aminosäuresequenzen, als auch die Überlagerung der RNase H Strukturen zeigten ein hohes Maß an Identität für Bereiche mit Sekundärstrukturelementen (Abb. 18A/B).



**Abb. 18: Die RDS1643 Bindung in der HIV-1 RNase H.** Um die Daten zur RDS1643-Bindung in der PFV RNase H auf die HIV-1 RNase H zu übertragen, wurde ein (A) Sequenzvergleich von Aminosäuresequenzen, sowie die dazugehörige (B) Strukturüberlagerung der RNase H Domänen aus PFV und HIV-1 erstellt. Die Tertiärstruktur der PFV RNase H (PDBDatei: 2LSN) ist in grau und die Struktur der HIV-1 RNase H (PDB Datei: 1HRH) in blau hinterlegt. Reste des aktiven Zentrums und Reste mit  $\Delta_{\text{norm}}$ -Wert  $\geq 0,02$  ppm sind entsprechend der Farbkodierung in Abb. 17A hervorgehoben. Der Inhibitor RDS1643 ist wie in Abb. 17B platziert (abgewandelt nach Einzelarbeit D, Abb. 5).

Besonders die Aminosäuren um das aktive Zentrum waren in beiden RNase H Domänen sehr ähnlich. So war es möglich die spektroskopischen Daten zur PFV RNase H direkt auf die RNase H aus HIV-1 zu übertragen. Den Resten T641, I647, Y672 und W703 in der hydrophoben RDS1643-Bindungskavität in der PFV RNase H konnten die Aminosäurereste T473, L479, Y501 und V518 in der HIV-1 RNase H zugeordnet werden. Unter den genannten Aminosäureresten der HIV-1 RNase H befinden sich konservierte Aminosäuren (T473, Y501), welche Bestandteil der sogenannten "primer grip"-Regionen sind. Diese Region ist für die Bindung und Positionierung des DNA-Stranges in der RNase H wichtig und führt bei Mutationen an Positionen 473 und 501 zu nicht lebensfähigen Viren (Ding *et al.*, 1998; Julius *et al.*, 2003). Wechselwirkungen von RDS1543 mit T473, Y501, sowie den  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen könnten zwar die RNA/DNA-Bindung in der RNase H verändern, jedoch eine Verdrängung des Hybrids aus der RNase H erscheint hier unwahrscheinlich. Dementsprechend konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung der HIV-1 RNase H-Aktivität durch das RDS1643 nicht kompetitiven Charakter hat (Tramontano *et al.*, 2005).

### 3.4 Ausblick

Basierend auf neuen Hochdurchsatz-Synthesetechniken können heutzutage zahlreiche Derivate von RHIs innerhalb kurzer Zeit hergestellt werden und erfordern geeignete Analysetechniken. Mittels einer Kombination aus NMR-Spektroskopie und *in silico*-Modellierung ist es gelungen die RDS1643-Bindung in der PFV RNase H zu visualisieren und die Bindungsposition in der HIV-1 RNase H zu rekonstruieren. Unter Einbeziehung der PFV Polymerasedomäne als Modellsystem könnte diese Methode in zukünftigen Experimenten auch auf die HIV-1 Polymerasedomäne ausgeweitet werden. Hierbei könnten die, in dieser Arbeit vorgestellten, verkürzten SFVmac PR-RT-Konstrukte helfen die Bindungsstellen neuer HIV-1 RHIs und der daraus resultierenden Resistenzmechanismen mittels NMR-spektroskopischer Studien zu untersuchen.

## 4 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	erworbenen Immundefizienzsyndrom ( <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> )
APOBEC3G	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide like 3G</i>
AZT	3'-Azido-3'-desoxythymidin (Azidothymidin oder Zidovudin)
AZTMP	AZT-5'-Monophosphat
AZT-P4-A	AZT-5'-tetraphospho-Adenosin
AZTTP	AZT-5'-Triphosphat
CA	Kapsidprotein
cDNA	komplementärer DNA-Strang ( <i>complementary DNA</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
ds	doppelsträngig ( <i>double stranded</i> )
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FVs	Foamyviren
HAART	Hoch Aktive Antiretrovirale Therapie ( <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i> )
HFV	Humanes Foamyvirus
HIV-1/2	Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 und 2 ( <i>human immunodeficiency virus type 1 and 2</i> )
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HTLV	Humanes T-Zell-lymphotropes Virus ( <i>human T-cell lymphotropic virus</i> )
IN	Integrase
IP	interner Promotor
kb	Kilobasen
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>M</sub>	Michaeliskonstante
LTR	lange terminale Wiederholungssequenz ( <i>long terminal repeat</i> )
MA	Matrixprotein

---

MMTV	Maus-Mammatumovirus (mouse mammary tumor virus)
MoMLV	Moloney Mäuseleukämievirus ( <i>moloney murine leukemia virus</i> )
MPMV	Mason-Pfizer Affenvirus
<i>mt2a</i>	K211I, S345T (AZT-Resistenzsubstitutionen in der SFVmac PR-RT)
<i>mt2b</i>	K211I, E350K (AZT-Resistenzsubstitutionen in der SFVmac PR-RT)
<i>mt2c</i>	S345T, E350K (AZT-Resistenzsubstitutionen in der SFVmac PR-RT)
<i>mt3</i>	K211I, S345T, E350K (AZT-Resistenzsubstitutionen in der SFVmac PR-RT)
<i>mt4</i>	K211I, I224T, S345T, E350K (AZT-Resistenzsubstitutionen in der SFVmac RT)
NC	Nukleokapsidprotein
NMR	Kernspinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NNRTIs	Nicht-Nukleosid-RT-Inhibitoren
N-Position	Nukleotidbindungsposition
NRTIs	Nukleosid-RT-Inhibitoren
NtRTIs	Nukleotid-RT-Inhibitoren
P	Hauptpromotor im FV Genom
PARM	PR-aktivierendes-RNA-Motiv ( <i>PR activating motif</i> )
PBS	Primerbindungsstelle ( <i>primer binding site</i> )
PFV	Prototypes Foamyvirus ( <i>prototype foamy virus</i> )
PPi	Pyrophosphat
P-Position	Primerbindungsposition
PPT	purinreicher Sequenzabschnitt ( <i>polypurine tract</i> )
PR	Protease
PRshort	PR (Aminosäurepositionen 1 bis 101 in der SFVmac PR-RT)
RDDP	RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität ( <i>RNA-dependent DNA polymerase activity</i> )
RHIs	RNase H Inhibitoren
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase H	Ribonuklease H



RSV	Rous-Sarkomvirus ( <i>rous sarcoma virus</i> )
RT	Reverse Transkriptase
RT <sub>AZT</sub>	AZT-resistente RT
RTshort	N-terminales Fragment der SFVmac RT aus den Subdomänen Finger und Handfläche (Aminosäuren 107 bis 368)
RTwt	Wildtypische RT
SFVmac	Affen Foamyvirus aus Makaken ( <i>simian foamy virus of macaques</i> )
<i>site I</i>	ATP-Bindungsstelle <i>I</i>
<i>site II</i>	ATP-Bindungsstelle <i>II</i>
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TROSY	<i>transverse relaxation optimized spectroscopy</i>
U3 und U5	unikale 3' und 5' Region ( <i>unique 3' and 5' region</i> )
v <sub>max</sub>	maximalen Reaktionsgeschwindigkeit
WDSV	Zander-Hautsarkomvirus ( <i>walleye dermal sarcoma virus</i> )
WT	Wildtyp
XMRV	Xenotrophisches Mäuseleukämie verwandtes Virus ( <i>xenotropic murine leukemia virus related virus</i> )



## 5 Literaturverzeichnis

**Abram ME, Ferris AL, Das K, Quinoñes O, Shao W, Tuske S, Alvord WG, Arnold E und Hughes SH** (2014) Mutations in HIV-1 reverse transcriptase affect the errors made in a single cycle of viral replication. *J Virol* **88**: 7589-7601

**Achong BG, Mansell PW, Epstein MA und Clifford P** (1971) An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **46**: 299-307

**Aguzzi A** (1993) The foamy virus family: molecular biology, epidemiology and neuropathology. *Biochim Biophys Acta* **1155**: 1-24

**Arion D, Sluis-Cremer N, Min KL, Abram ME, Fletcher RS und Parniak MA** (2002) Mutational analysis of Tyr-501 of HIV-1 reverse transcriptase - Effects on ribonuclease h activity and inhibition of this activity by N-acylhydrazones. *J Biol Chem* **277**: 1370-1374

**Arnold E, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Williams RL, Lu X, Ding J, Clark AD, Jr., Zhang A, Ferris AL, Clark P, Hizi A und Hughes SH** (1992) Structure of HIV-1 reverse transcriptase/DNA complex at 7 Å resolution showing active site locations. *Nature* **357**: 85-89

**Arnold K, Bordoli L, Kopp J und Schwede T** (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201

**Baltimore D** (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* **226**: 1209-11

**Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W und Montagnier L** (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871

**Beilhartz GL, Götte M** (2010) HIV-1 ribonuclease h: Structure, Catalytic Mechanism and Inhibitors. *Viruses* **2**: 900-926

**Ben-Artzi H, Zeelon E, Le Grice SJ, Gorecki M und Panet A** (1992) Characterization of the double stranded RNA dependent RNase activity associated with recombinant reverse transcriptases. *Nucleic Acids Res* **20**: 5115-5118

**Betsem E, Rua R, Tortevoye P, Froment A und Gessain A** (2011) Frequent and recent human acquisition of simian foamy viruses through apes bites in central africa. *PLoS Pathog* **7**: e1002306

**Billamboz M, Bailly F, Lion C, Touati N, Vezin H, Calmels C, Andréola ML, Christ F, Debyser Z und Cotelle P** (2011) Magnesium chelating 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones, as inhibitors of HIV-1 integrase and/or the HIV-1 reverse transcriptase ribonuclease h domain: Discovery of a novel selective inhibitor of the ribonuclease h function. *J Med Chem* **54**: 1812-1824

**Borkow G, Fletcher RS, Barnard J, Arion D, Motakis D, Dmitrienko GI und Parniak MA** (1997) Inhibition of the ribonuclease h and DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase by N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone. *Biochemistry* **36**: 3179-3185

**Boyer PL, Clark PK und Hughes SH** (2012) HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases: different mechanisms of resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Virol* **86**: 5885-5894

- Boyer PL, Hughes SH** (1995) Analysis of mutations at position 184 in reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1624-1628
- Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E und Hughes SH** (2002) The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **76**: 3248-3256
- Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E und Hughes SH** (2001) Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* **75**: 4832-4842
- Boyer PL, Sarafianos SG, Clark PK, Arnold E und Hughes SH** (2006) Why do HIV-1 and HIV-2 use different pathways to develop AZT resistance? *PLoS Pathog* **2**: e10
- Boyer PL, Stenbak CR, Clark PK, Linial ML und Hughes SH** (2004) Characterization of the polymerase and RNase H activities of human foamy virus reverse transcriptase. *J Virol* **78**: 6112-6121
- Brautigam CA, Steitz TA** (1998) Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 54-63
- Bryant M, Rather L** (1990) Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 527-523
- Budihas SR, Gorshkova I, Gaidamakov S, Wamiru A, Bona MK, Parniak MA, Crouch RJ, McMahan JB, Beutler JA und Le Grice SF** (2005) Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease h activity ribonuclease h by hydroxylated tropolones. *Nucleic Acids Res* **33**: 1249-1256
- Cartellieri M, Herchenroder O, Rudolph W, Heinkelein M, Lindemann D, Zentgraf H und Rethwilm A** (2005a) N-terminal gag domain required for foamy virus particle assembly and export. *J Virol* **79**: 12464-12476
- Cartellieri M, Rudolph W, Herchenröder O, Lindemann D und Rethwilm A** (2005b) Determination of the relative amounts of gag and pol proteins in foamy virus particles. *Retrovirology* **44**: 1-17
- Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer III AG, Rance M, Skelton NJ** (2007) *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*, Ed 2nd ed. Academic Press, Boston.
- Charneau P, Alizon M und Clavel F** (1992) A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **66**: 2814-2820
- Christen MT, Menon L, Myshakina NS, Ahn J, Parniak MA und Ishima R** (2012) Structural basis of the allosteric inhibitor interaction on the HIV-1 reverse transcriptase RNase H domain. *Chem Biol Drug Des* **80**: 706-716
- Chung S, Himmel DM, Jiang JK, Wojtak K, Bauman JD, Rausch JW, Wilson JA, Beutler JA, Thomas CJ, Arnold E und Le Grice SF** (2011) Synthesis, activity, and structural analysis of novel alpha-hydroxytropolone inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated ribonuclease h. *J Med Chem* **54**: 4462-4473
- Chung S, Miller JT, Johnson BC, Hughes SH und Le Grice SF** (2012) Mutagenesis of human immunodeficiency virus reverse transcriptase p51 subunit defines residues contributing to vinylogous urea inhibition of ribonuclease h activity. *J Biol Chem* **287**: 4066-4075

- Chung S, Wendeler M, Rausch JW, Beilhartz G, Gotte M, O'Keefe BR, Bermingham A, Beutler JA, Liu S, Zhuang X und Le Grice SF** (2010) Structure-activity analysis of vinylogous urea inhibitors of human immunodeficiency virus-encoded ribonuclease h. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 3913-3921
- Corona A, Di Leva FS, Thierry S, Pescatori L, Cuzzucoli Crucitti G, Subra F, Delelis O, Esposito F, Rigogliuso G, Costi R, Cosconati S, Novellino E, Di Santo R und Tramontano E** (2014) Identification of highly conserved residues involved in inhibition of HIV-1 RNase H function by diketo acid derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 6101-6110
- Cote ML, Roth MJ** (2008) Murine leukemia virus reverse transcriptase: structural comparison with HIV-1 reverse transcriptase. *Virus Res* **134**: 186-202
- Cullen BR** (1998) HIV-1 Auxiliary Proteins: Making Connections in a Dying Cell. *Cell* **93**: 685-692
- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF und Weiss RA** (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**: 763-767
- Das D, Georgiadis MM** (2004) The crystal structure of the monomeric reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus. *Structure* **12**: 819-829
- Das K, Bandwar RP, White KL, Feng JY, Sarafianos SG, Tuske S, Tu X, Clark AD, Jr, Boyer PL, Hou X, Gaffney BL, Jones RA, Miller MD, Hughes SH und Arnold E** (2009) Structural basis for the role of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase polymerization, excision antagonism, and tenofovir resistance. *J Biol Chem* **284**: 35092-35100
- Davies JF, 2nd, Hostomska Z, Hostomsky Z, Jordan SR und Matthews DA** (1991) Crystal structure of the ribonuclease h domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **252**: 88-95
- Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Barr R und Pathak VK** (2007) Mutations in human immunodeficiency virus type 1 RNase H primer grip enhance 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *J Virol* **81**: 6837-6845
- Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Boyer PL, Hughes SH, Coffin JM, Jere A und Pathak VK** (2008) HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain mutations reduce template RNA degradation and enhance AZT excision. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10943-10948
- Di Marzo Veronese F, Copeland TD, DeVico AL, Rahman R, Oroszlan S, Gallo RC und Sarngadharan MG** (1986) Characterization of highly immunogenic p66/51 as the reverse transcriptase of HTLVIII/LAV. *Science* **231**: 1289-1291
- Ding J, Das K, Hsiou Y, Sarafianos SG, Clark AD, Jr, Jacobo-Molina A, Tantillo C, Hughes SH und Arnold E** (1998) Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **284**: 1095-1111
- Ding J, Das K, Moereels H, Koymans L, Andries K, Janssen PA, Hughes SH und Arnold E** (1995) Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* **2**: 407-415
- Distinto S, Esposito F, Kirchmair J, Cardia MC, Gaspari M, Maccioni E, Alcaro S, Markt P, Wolber G, Zinzula L und Tramontano E** (2012) Identification of HIV-1 reverse transcriptase dual inhibitors by a combined shape-, 2D-fingerprint- and pharmacophore-based virtual screening approach. *Eur J Med Chem* **50**: 216-229

- Distinto S, Maccioni E, Meleddu R, Corona A, Alcaro S und Tramontano E** (2013) Molecular aspects of the RT/drug interactions. Perspectives of dual inhibitors. *Curr Pharm Des* **19**: 1850-1859
- Dunn BM, Goodenow MM, Gustchina A und Wlodawer A** (2002) Retroviral proteases. *Genome Biol* **3**: 1465-6914
- Enders JF, Peebles TC** (1954) Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* **86**: 277-286
- Enssle J, Fischer N, Moebes A, Mauer B, Smola U und Rethwilm A** (1997) Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J Virol* **71**: 7312-7317
- Enssle J, Jordan I, Mauer B und Rethwilm A** (1996) Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the gag protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4137-4141
- Entin-Meer M, Avidan O und Hizi A** (2003) The mature reverse transcriptase molecules in virions of mouse mammary tumor virus possess protease-derived sequences. *Virology* **310**: 157-162
- Esposito F, Corona A und Tramontano E** (2012) HIV-1 reverse transcriptase still remains a new drug target: structure, function, classical inhibitors, and new inhibitors with innovative mechanisms of actions. *Mol Biol Int* **2012**: 586401
- Felts AK, Labarge K, Bauman J, Patel D, Himmel DM, Arnold E, Parniak MA und Levy RM** (2011) Identification of alternative binding sites for inhibitors of HIV-1 ribonuclease h through comparative analysis of virtual enrichment studies. *J Chem Inf Model* **51**: 1986-1998
- Fischer N, Heinkelein M, Lindemann D, Enssle J, Baum C, Werder E, Zentgraf H, Muller JG und Rethwilm A** (1998) Foamy virus particle formation. *J Virol* **72**: 1610-1615
- Flügel RM, Pfrepper KI** (2003) Proteolytic processing of foamy virus gag and pol proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **277**: 63-88
- Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, Weinhold K, Rideout JL, Freeman GA, Lehrman SN, Bolognesi DP, Broder S, Mitsuya H und .** (1986) Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 8333-8337
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J und Safai B** (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**: 500-503
- Garforth SJ, Domaal RA, Lwatula C, Landau MJ, Meyer AJ, Anderson KS und Prasad VR** (2010) K65R and K65A substitutions in HIV-1 reverse transcriptase enhance polymerase fidelity by decreasing both dNTP misinsertion and mispaired primer extension efficiencies. *J Mol Biol* **401**: 33-44
- Garforth SJ, Kim TW, Parniak MA, Kool ET und Prasad VR** (2007) Site-directed mutagenesis in the fingers subdomain of HIV-1 reverse transcriptase reveals a specific role for the beta3-beta4 hairpin loop in dNTP selection. *J Mol Biol* **365**: 38-49
- Gavegnano C, Kennedy EM, Kim B und Schinazi RF** (2012) The impact of macrophage nucleotide pools on HIV-1 reverse transcription, viral replication, and the development of novel antiviral agents. *Mol Biol Int* **2012**: 625983

- Georgiadis MM, Jessen SM, Ogata CM, Telesnitsky A, Goff SP und Hendrickson WA** (1995) Mechanistic implications from the structure of a catalytic fragment of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Structure* **3**: 879-892
- Goff SP** (2007) Retroviridae: The retroviruses and their replication. In DM Knipe, PM Howley, eds, *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1999-2069
- Goldschmidt V, Marquet R** (2004) Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs). *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 1687-1705
- Hanes JW, Johnson KA** (2007) A novel mechanism of selectivity against AZT by the human mitochondrial DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **35**: 6973-6983
- Harris D, Lee R, Misra HS, Pandey PK und Pandey VN** (1998) The p51 subunit of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is essential in loading the p66 subunit on the template primer. *Biochemistry* **37**: 5903-5908
- Hartl MJ, Wöhrl BM und Schweimer K** (2007) Sequence-specific <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignments and secondary structure of a truncated protease from simian foamy virus. *Biomol NMR Assign* **1**: 175-177
- Hartl MJ, Bodem J, Jochheim F, Rethwilm A, Rösch P und Wöhrl BM** (2011) Regulation of foamy virus protease activity by viral RNA - a novel and unique mechanism among retroviruses. *J Virol* **85**: 4462-4469
- Hartl MJ, Kretzschmar B, Frohn A, Nowrouzi A, Rethwilm A und Wöhrl BM** (2008) AZT resistance of simian foamy virus reverse transcriptase is based on the excision of AZTMP in the presence of ATP. *Nucleic Acids Res* **36**: 1009-1016
- Hartl MJ, Schweimer K, Reger MH, Schwarzinger S, Bodem J, Rösch P und Wöhrl BM** (2010) Formation of transient dimers by a retroviral protease. *Biochem J* **427**: 197-203
- Hartl MJ, Wöhrl BM, Rösch P und Schweimer K** (2008) The solution structure of the simian foamy virus protease reveals a monomeric protein. *J Mol Biol* **381**: 141-149
- Haseltine WA, Maxam AM und Gilbert W** (1977) Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 5' sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 989-993
- Heinkelein M, Leurs C, Rammling M, Peters K, Hanenberg H und Rethwilm A** (2002) Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J Virol* **76**: 10069-10073
- Heneine W, Schweizer M, Sandstrom P und Folks T** (2003) Human infection with foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **277**: 181-196
- Herchenröder O, Renne R, Loncar D, Cobb EK, Murthy KK, Schneider J, Mergia A und Luciw PA** (1994) Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* **201**: 187-199
- Hill M, Tachedjian G und Mak J** (2005) The Packaging and Maturation of the HIV-1 pol Proteins. *Current HIV Research* **3**: 73-85
- Himmel DM, Maegley KA, Pauly TA, Bauman JD, Das K, Dharia C, Clark AD, Jr, Ryan K, Hickey MJ, Love RA, Hughes SH, Bergqvist S und Arnold E** (2009) Structure of HIV-1 reverse transcriptase with the inhibitor beta-Thujaplicinol bound at the RNase H active site. *Structure* **17**: 1625-1635

- Himmel DM, Sarafianos SG, Dharmasena S, Hossain MM, McCoy-Simandle K, Iina T, Clark AD, Jr, Knight JL, Julias JG, Clark PK, Krogh-Jespersen K, Levy RM, Hughes SH, Parniak MA und Arnold E** (2006) HIV-1 reverse transcriptase structure with RNase H inhibitor dihydroxy benzoyl naphthyl hydrazone bound at a novel site. *ACS Chem Biol* **1**: 702-712
- Hogg RS, Rhone SA, Yip B, Sherlock C, Conway B, Schechter MT, O'Shaughnessy MV und Montaner JS** (1998) Antiviral effect of double and triple drug combinations amongst HIV-infected adults: lessons from the implementation of viral load-driven antiretroviral therapy. *AIDS* **12**: 279-284
- Hostomsky Z, Hostomska Z, Fu TB und Taylor J** (1992) reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1: functionality of subunits of the heterodimer in DNA synthesis. *J Virol* **66**: 3179-3182
- Huang HF, Chopra R, Verdine GV und Harrison SC** (1998) Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug design. *Science* **282**: 1669-1675
- Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G und Wain-Hobson S** (1990) Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**: 356-359
- Hunter E** (1994) Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Seminars in Virology* **5**: 71-83
- Hütter S, Müllers E, Stanke N, Reh J und Lindemann D** (2013) Prototype foamy virus protease activity is essential for intraparticle reverse transcription initiation but not absolutely required for uncoating upon host cell entry. *J Virol* **87**: 3163-3176
- Iina T, Labarge K, Sarafianos SG, Ishima R und Parniak MA** (2012) Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease h activity. *Biology (Basel)* **1**: 521-541
- Jacobo-Molina A, Clark AD, Jr., Williams RL, Nanni RG, Clark P, Ferris AL, Hughes SH und Arnold E** (1992) Crystals of a ternary complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a monoclonal Fab fragment and double stranded DNA diffract to 3.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10895-10899
- Jacobo-Molina A, Ding J, Nanni RG, Clark AD, Jr., Lu X, Tantillo C, Williams RL, Kamer G, Ferris AL, Clark P, Hizi A, Hughes SH und Arnold E** (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6320-6324
- Jacobs RM, Pollari FL, McNab WB und Jefferson B** (1995) A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Can J Vet Res* **59**: 271-278
- Julias JG, McWilliams MJ, Sarafianos SG, Alvord WG, Arnold E und Hughes SH** (2003) Mutation of amino acids in the connection domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that contact the template-primer affects RNase H activity. *J Virol* **77**: 8548-8554
- Kang Y, Blair WS und Cullen BR** (1998) Identification and functional characterization of a high-affinity Bel-1 DNA binding site located in the human foamy virus internal promoter. *J Virol* **72**: 504-511
- Katayanagi K, Miyagawa M, Matsushima M, Ishikawa M, Kanaya S, Ikehara M, Matsuzaki T und Morikawa K** (1990) Three-dimensional structure of ribonuclease h from *E. coli*. *Nature* **347**: 306-309



- Katayanagi K, Miyagawa M, Matsushima M, Ishikawa M, Kanaya S, Nakamura H, Ikehara M, Matsuzaki T und Morikawa K** (1992) Structural details of ribonuclease h from *Escherichia coli* as refined to an atomic resolution. *J Mol Biol* **223**: 1029-1052
- Katoh I, Ikawa Y und Yoshinaka Y** (1989) Retrovirus protease characterized as a dimeric aspartic proteinase. *J Virol* **63**: 2226-2232
- Keck JL, Marqusee S** (1995) Substitution of a highly basic helix/loop sequence into the RNase H domain of human immunodeficiency virus reverse transcriptase restores its  $Mn^{2+}$  dependent RNase H activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2740-2744
- Kellam P, Boucher CA und Larder BA** (1992) Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1934-1938
- Kellam P, Boucher CA, Tijnagel JM und Larder BA** (1994) Zidovudine treatment results in the selection of human immunodeficiency virus type 1 variants whose genotypes confer increasing levels of drug resistance. *J Gen Virol* **75**: 341-351
- Keller A, Partin KM, Lochelt M, Bannert H, Flugel RM und Cullen BR** (1991) Characterization of the transcriptional trans activator of human foamy retrovirus. *J Virol* **65**: 2589-2594
- Kellinger MW, Johnson KA** (2011) Role of induced-fit in limiting discrimination against AZT by HIV reverse transcriptase. *Biochemistry* **50**: 5008-5015
- Kellinger MW, Johnson KA** (2010) Nucleotide-dependent conformational change governs specificity and analog discrimination by HIV reverse transcriptase. *PNAS* **107**: 7734-7739
- Kennedy HJ, Pouli AE, Ainscow EK, Jouaville LS, Rizzuto R und Rutter GA** (1999) Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet beta-cells. Potential role for strategically located mitochondria. *J Biol Chem* **274**: 13281-13291
- Kirschberg TA, Balakrishnan M, Squires NH, Barnes T, Brendza KM, Chen X, Eisenberg EJ, Jin W, Kutty N, Leavitt S, Licican A, Liu Q, Liu X, Mak J, Perry JK, Wang M, Watkins WJ und Lansdon EB** (2009) RNase H active site inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: design, biochemical activity, and structural information. *J Med Chem* **52**: 5781-5784
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC und Montagnier L** (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**: 767-768
- Klebe G** (2009) Wirkstoffdesign, Ed 2. Springer Spektrum Verlag, Heidelberg, pp 249
- Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA und Steitz TA** (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**: 1783-1790
- Kretzschmar B, Nowrouzi A, Hartl MJ, Gärtner K, Wiktorowicz T, Herchenröder O, Kanzler S, Rudolph W, Mergia A, Wöhrl B und Rethwilm A** (2008) AZT-resistant foamy virus. *Virology* **370**: 151-157
- Krizova I, Hadravova R, Stokrova J, Gunterova J, Dolezal M, Ruml T, Rumlova M und Pichova I** (2012) The G-patch domain of Mason-Pfizer monkey virus is a part of reverse transcriptase. *J Virol* **86**: 1988-1998

- Kupiec JJ, Tobaly-Tapiero J, Canivet M, Santillana-Hayat M, Flügel RM, Peries J und Emanoil-Ravier R** (1988) Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses. *Nucleic Acids Res* **16**: 9557-9565
- Lansdon EB, Liu Q, Leavitt SA, Balakrishnan M, Perry JK, Lancaster-Moyer C, Kutty N, Liu X, Squires NH, Watkins WJ und Kirschberg TA** (2011) Structural and binding analysis of pyrimidinol carboxylic acid and N-hydroxy quinazolinone HIV-1 RNase H inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 2905-2915
- Larder BA, Darby G und Richman DD** (1989) HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* **243**: 1731-1734
- Le Grice SF, Naas T, Wohlgensinger B und Schatz O** (1991) Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J* **10**: 3905-3911
- Le Grice SFJ, Howard KJ, Cirino NM, Wöhrl BM, Barat C, Naas T, Schatz O, Darlix J** (1992) Role of HIV-1 reverse transcriptase subunits in enzyme structure and function. In DMJ Lilley, H Heumann, D Suck, eds. *Structural tools for the analysis of protein-nucleic acid complexes*. Basel Switzerland, Birkhäuser Verlag, pp 369-390
- Lee EG, Linial ML** (2008) The C terminus of foamy retrovirus gag contains determinants for encapsidation of pol protein into virions. *J Virol* **82**: 10803-10810
- Leo B, Hartl MJ, Schweimer K, Mayr F und Wöhrl BM** (2012a) Insights into the structure and activity of prototype foamy virus RNase H. *Retrovirology* **9**: 14
- Leo B, Schweimer K, Rösch P, Hartl MJ und Wöhrl BM** (2012b) The solution structure of the prototype foamy virus RNase H domain indicates an important role of the basic loop in substrate binding. *Retrovirology* **9**: 73
- Lim D, Gregorio GG, Bingman C, Martinez-Hackert E, Hendrickson WA und Goff SP** (2006) Crystal structure of the moloney murine leukemia virus RNase H domain. *J Virol* **80**: 8379-8389
- Löchelt M, Flügel RM** (1996) The human foamy virus pol gene is expressed as a pro-pol polyprotein and not as a gag-pol fusion protein. *J Virol* **70**: 1033-1040
- Löchelt M, Romen F, Bastone P, Muckenfuss H, Kirchner N, Kim YB, Truyen U, Rosler U, Battenberg M, Saib A, Flory E, Cichutek K und Munk C** (2005) The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory bet protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7982-7987
- Maurer B, Bannert H, Darai G und Flügel RM** (1988) Analysis of the primary structure of the long terminal repeat and the gag and pol genes of the human spumaretrovirus. *J Virol* **62**: 1590-1597
- Meiering CD, Linial ML** (2001) Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev* **14**: 165-176
- Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG und Scott WA** (1999) A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell* **4**: 35-43
- Meyer PR, Matsuura SE, So AG und Scott WA** (1998) Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13471-13476

- Mitsuya H, Broder S** (1986) Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 1911-1915
- Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW und Broder S** (1985) 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 7096-7100
- Moebes A, Enssle J, Bieniasz PD, Heinkelein M, Lindemann D, Bock M, McClure MO und Rethwilm A** (1997) Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* **71**: 7305-7311
- Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA und Capon DJ** (1985) Nucleic acid structure and expression of the human aids/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**: 450-458
- Najmudin S, Cote ML, Sun D, Yohannan S, Montano SP, Gu J und Georgiadis MM** (2000) Crystal structures of an N-terminal fragment from moloney murine leukemia virus reverse transcriptase complexed with nucleic acid: functional implications for template-primer binding to the fingers domain. *J Mol Biol* **296**: 613-632
- Nasimuzzaman Md und Persons DA** (2012) Cell membrane-associated heparan sulfate is a receptor for prototype foamy virus in human monkey and rodent cells. *Mol Ther* **20**: 1158-1166
- Nowak E, Potrzebowski W, Konarev PV, Rausch JW, Bona MK, Svergun DI, Bujnicki JM, Le Grice SF und Nowotny M** (2013) Structural analysis of monomeric retroviral reverse transcriptase in complex with an RNA/DNA hybrid. *Nucleic Acids Res* **41(6)**: 3874-3887
- Olszko ME, Trobridge GD** (2013) Foamy virus vectors for HIV gene therapy. *Viruses* **5**: 2585-2600
- Oude Essink BB, Back NK und Berkhout B** (1997) Increased polymerase fidelity of the 3TC-resistant variants of HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* **25**: 3212-3217
- Pari K, Mueller GA, DeRose EF, Kirby TW und London RE** (2003) Solution structure of the RNase H domain of the HIV-1 reverse transcriptase in the presence of magnesium. *Biochemistry* **42**: 639-650
- Pearl LH, Taylor WR** (1987) A structural model for the retroviral proteases. *Nature* **329**: 351-354
- Perkovic M, Schmidt S, Marino D, Russell RA, Stauch B, Hofmann H, Kopietz F, Kloke BP, Zielonka J, Strover H, Hermle J, Lindemann D, Pathak VK, Schneider G, Lochelt M, Cichutek K und Munk C** (2009) Species-specific inhibition of APOBEC3C by the prototype foamy virus protein bet. *J Biol Chem* **284**: 5819-5826
- Pervushin K** (2000) Impact of transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) on NMR as a technique in structural biology. *Q Rev Biophys* **33**: 161-197
- Pfrepper KI, Löchelt M, Rackwitz HR, Schnölzer M, Heid H und Flügel RM** (1999) Molecular characterization of proteolytic processing of the gag proteins of human spumavirus. *J Virol* **73**: 7907-7911
- Pfrepper KI, Rackwitz HR, Schnölzer M, Heid H, Löchelt M und Flügel RM** (1998) Molecular characterization of proteolytic processing of the pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease. *J Virol* **72**: 7648-7652
- Picard-Maureau M, Jarmy G, Berg A, Rethwilm A und Lindemann D** (2003) Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J Virol* **77**: 4722-4730

- Plochmann K, Horn A, Gschmack E, Armbruster N, Krieg J, Wiktorowicz T, Weber C, Stirnagel K, Lindemann D, Rethwilm A und Scheller C** (2012) Heparan sulfate is an attachment factor for foamy virus entry. *J Virol* **86**: 10028-10035
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M und Tordo N** (1989) Identification of four conserved motifs among the rna-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* **8**: 3867-3874
- Raba M, Limburg K, Burghagen M, Katze JR, Simsek M, Heckman JE, Rajbhandary UL und Gross HJ** (1979) Nucleotide sequence of three isoaccepting lysine trnas from rabbit liver and sv40-transformed mouse fibroblasts. *Eur J Biochem* **97**: 305-318
- Ren J, Esnouf R, Garman E, Somers D, Ross C, Kirby I, Keeling J, Darby G, Jones Y, Stuart D und Stammers D** (1995) High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat Struct Biol* **2**: 293-302
- Rethwilm A** (2010) Molecular biology of foamy viruses. *Med Microbiol Immunol* **199**: 197-207
- Rethwilm A** (2005) Foamy Viruses. In V ter Meulen, BWJ Mahy, eds, *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections - Virology Vol 10, Vol.2*. Hodder Arnold, London, pp 1304-1321
- Rinke CS, Boyer PL, Sullivan MD, Hughes SH und Linial ML** (2002) Mutation of the catalytic domain of the foamy virus reverse transcriptase leads to loss of processivity and infectivity. *J Virol* **76**: 7560-7570
- Rosenblum LL, Patton G, Grigg AR, Frater AJ, Cain D, Erlwein O, Hill CL, Clarke JR und McClure MO** (2001) Differential susceptibility of retroviruses to nucleoside analogues. *Antivir Chem Chemother* **12**: 91-97
- Roth MJ, Tanese N und Goff SP** (1985) Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **260**: 9326-9335
- Roy J, Linial ML** (2007) Role of the foamy virus pol cleavage site in viral replication. *J Virol* **81**: 4956-4962
- Roy J, Rudolph W, Juretzek T, Gartner K, Bock M, Herchenröder O, Lindemann D, Heinkelein M und Rethwilm A** (2003) Feline foamy virus genome and replication strategy. *J Virol* **77**: 11324-11331
- Russell DW, Miller AD** (1996) Foamy virus vectors. *J Virol* **70**: 217-222
- Russell RA, Wiegand HL, Moore MD, Schafer A, McClure MO und Cullen BR** (2005) Foamy virus bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol* **79**: 8724-8731
- Sarafianos SG, Clark AD, Jr., Das K, Tuske S, Birktoft JJ, Iankumaran P, Ramesha AR, Sayer JM, Jerina DM, Boyer PL, Hughes SH und Arnold E** (2002) Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *EMBO J* **21**: 6614-6624
- Sarafianos SG, Pandey VN, Kaushik N und Modak MJ** (1995) Site-directed mutagenesis of arginine 72 of HIV-1 reverse transcriptase. Catalytic role and inhibitor sensitivity. *J Biol Chem* **270**: 19729-19735
- Schatz O, Cromme FV, Gruninger-Leitch F und Le Grice SF** (1989) Point mutations in conserved amino acid residues within the C- terminal domain of HIV-1 reverse transcriptase specifically repress RNase H function. *FEBS Lett* **257**: 311-314

- Schooley RT, Ramirez-Ronda C, Lange JM, Cooper DA, Lavelle J, Lefkowitz L, Moore M, Larder BA, St Clair M, Mulder JW, McKinnis R, Pennington KN, Harrigan PR, Kinghorn I, Steel H und Rooney JF** (1996) Virologic and immunologic benefits of initial combination therapy with zidovudine and zalcitabine or didanosine compared with zidovudine monotherapy. Wellcome Resistance Study Collaborative Group. *J Infect Dis* **173**: 1354-1366
- Schultz SJ, Champoux JJ** (1996) RNase H domain of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase retains activity but requires the polymerase domain for specificity. *J Virol* **70**: 8630-8638
- Sharaf NG, Poliner E, Slack RL, Christen MT, Byeon IL, Parniak MA, Gronenborn AM und Ishim R** (2014) The p66 immature precursor of HIV-1 reverse transcriptase. *Proteins* **82**: 2343-2352
- Shaw-Reid CA, Munshi V, Graham P, Wolfe A, Witmer M, Danzeisen R, Olsen DB, Carroll SS, Embrey M, Wai JS, Miller MD, Cole JL und Hazuda DJ** (2003) Inhibition of HIV-1 ribonuclease h by a novel diketo acid, 4-[5-(benzoylamino)thien-2-yl]-2,4-dioxobutanoic acid. *J Biol Chem* **278**: 2777-2780
- Sluis-Cremer N, Arion D, Abram ME und Parniak MA** (2004) Proteolytic processing of an HIV-1 pol polyprotein precursor: insights into the mechanism of reverse transcriptase p66/p51 heterodimer formation. *IJBCB* **36**: 1836-1847
- Smith JK, Cywinski A und Taylor JM** (1984) Initiation of plus-strand DNA synthesis during reverse transcription of an avian retrovirus genome. *J Virol* **49**: 200-204
- Smith JS, Gritsman K und Roth MJ** (1994) Contributions of DNA polymerase subdomains to the RNase H activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* **68**: 5721-5729
- Smith JS, Roth MJ** (1992) Specificity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease h in removal of the minus- strand primer, tRNA(lys3). *J Biol Chem* **267**: 15071-15079
- Spannaus R, Hartl MJ, Wöhrl BM, Rethwilm A und Bodem J** (2012) The prototype foamy virus protease is active independently of the integrase domain. *Retrovirology* **9**: 41
- St Clair MH, Richards CA, Spector T, Weinhold KJ, Miller WH, Langlois AJ und Furman PA** (1987) 3'-Azido-3'-deoxythymidine triphosphate as an inhibitor and substrate of purified human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **31**: 1972-1977
- Stahl SJ, Kaufman JD, Vikić-Topić S, Crouch RJ und Wingfield PT** (1994) Construction of an enzymatically active ribonuclease h domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Protein Eng* **7**: 1103-1108
- Steitz TA, Steitz JA** (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6498-6502
- Stirnagel K, Schupp D, Dupont A, Kudryavtsev V, Reh J, Müllers E, Lamb DC und Lindemann D** (2012) Differential pH-dependent cellular uptake pathways among foamy viruses elucidated using dual-colored fluorescent particles. *Retrovirology* **9**:71
- Su HP, Yan Y, Prasad GS, Smith RF, Daniels CL, Abeywickrema PD, Reid JC, Loughran HM, Kornienko M, Sharma S, Grobler JA, Xu B, Sardana V, Allison TJ, Williams PD, Darke PL, Hazuda DJ und Munshi S** (2010) Structural basis for the inhibition of RNase H activity of HIV-1 reverse transcriptase by RNase H active site-directed inhibitors. *J Virol* **84**: 7625-7633

- Suchaud V, Bailly F, Lion C, Tramontano E, Esposito F, Corona A, Christ F, Debyser Z und Cotelle P** (2012) Development of a series of 3-hydroxyquinolin-2(1H)-ones as selective inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase associated RNase H activity. *Bioorg Med Chem Lett* **22**: 3988-3992
- Switzer WM, Bhullar V, Shanmugam V, Cong ME, Parekh B, Lerche NW, Yee JL, Ely JJ, Boneva R, Chapman LE, Folks TM und Heneine W** (2004) Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *J Virol* **78**: 2780-2789
- Taube R, Loya S, Avidan O, Perach M und Hizi A** (1998) Reverse transcriptase of mouse mammary tumour virus: expression in bacteria, purification and biochemical characterization. *Biochem J* **332**: 807-808
- Temin HM** (1964) Nature of the provirus of rous sarcoma. *National Cancer Institute Monograph* **17**: 557-570
- Temin HM, Mizutani S** (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of rous sarcoma virus. *Nature* **226**: 1211-1213
- Tobaly-Tapiero J, Bittoun P, Neves M, Guillemain MC, Lecellier CH, Puvion-Dutilleul F, Gicquel B, Zientara S, Giron ML, De Thé H und Saib A** (2000) Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J Virol* **74**: 4064-4073
- Tramontano E** (2006) HIV-1 RNase H: recent progress in an exciting, yet little explored, drug target. *Mini Rev Med Chem* **6**: 727-737
- Tramontano E, Di Santo R** (2010) HIV-1 RT-associated RNase H function inhibitors: Recent advances in drug development. *Curr Med Chem* **17**: 2837-2853
- Tramontano E, Esposito F, Badas R, Di Santo R, Costi R und La Colla P** (2005) 6-[1-(4-Fluorophenyl)methyl-1H-pyrrol-2-yl]-2,4-dioxo-5-hexenoic acid ethyl ester a novel diketo acid derivative which selectively inhibits the HIV-1 viral replication in cell culture and the ribonuclease h activity in vitro. *Antiviral Res* **65**: 117-124
- Trobridge G, Josephson N, Vassilopoulos G, Mac J und Russell DW** (2002) Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol Ther* **6**: 321-328
- Trobridge G, Russell DW** (2004) Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors. *J Virol* **78**: 2327-2335
- Trobridge GD, Miller DG, Jacobs MA, Allen, J.M., Kiem HP, Kaul R und Russell DW** (2006) Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1498-1503
- Trott O, Olson AJ** (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* **31**: 455-461
- Tu X, Das K, Han Q, Bauman JD, Clark AD, Jr, Hou X, Frenkel YV, Gaffney BL, Jones RA, Boyer PL, Hughes SH, Sarafianos SG und Arnold E** (2010) Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1202-1209
- Wishart DS, Sykes BD und Richards FM** (1991) Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J Mol Biol* **222**: 311-333
- Yu SF, Edelmann K, Strong RK, Moebes A, Rethwilm A und Linial ML** (1996) The carboxyl terminus of the human foamy virus gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *J Virol* **70**: 8255-8262

**Yu SF, Sullivan MD und Linial ML** (1999) Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* **73**: 1565-1572

**Zemba M, Wilk T, Rutten T, Wagner A, Flügel RM und Löchelt M** (1998) The carboxy-terminal p3gag domain of the human foamy virus gag precursor is required for efficient virus infectivity. *Virology* **247**: 7-13

**Zhan X, Crouch RJ** (1997) The isolated RNase H domain of murine leukemia virus reverse transcriptase. Retention of activity with concomitant loss of specificity. *J Biol Chem* **272**: 22023-22029

**Zheng X, Pedersen LC, Gabel SA, Mueller GA, Cuneo MJ, DeRose EF, Krahn JM und London RE** (2014) Selective unfolding of one ribonuclease h domain of HIV reverse transcriptase is linked to homodimer formation. *Nucl Acids Res* **42**: 5361-5377





## 6 Publikationsliste

### **Einzelarbeit A**

Anna Schneider, Daniel Peter, Jessica Schmitt, Berit Leo, Franziska Richter, Paul Rösch, Birgitta M. Wöhl und Maximilian J. Hartl (2013): Structural requirements for enzymatic activities of foamy virus protease-reverse transcriptase. *Proteins* **83**: 375-385.

Die Klonierungen und Reinigungen der SFVmac PR-RT Deletionsvarianten wurden von mir, zusammen mit Daniel Peter, Jessica Schmitt und Maximilian J. Hartl realisiert. Außerdem war ich für die Etablierung, Durchführung und Auswertung der Experimente zur Prozessivität und Polymerisationsinitiation der SFVmac PR-RT Deletionsvarianten verantwortlich. Ich habe die NMR-Spektren aufgenommen und zusammen mit Maximilian J. Hartl und ausgewertet. Die Protease-Aktivitätstests wurden von Franziska Richter und Maximilian Hartl vorgenommen. Berit Leo war für die Reinigung der RNase H und die RNase H-Aktivitätstests verantwortlich. Paul Rösch unterstützte die Arbeit finanziell und konzeptionell. Birgitta M. Wöhl und Maximilian J. Hartl planten und betreuten die Versuche. Das Manuskript wurde von Birgitta M. Wöhl mit Maximilian J. Hartl und mir verfasst.

### **Einzelarbeit B**

Ralf Spannaus, Anna Schneider, Maximilian J. Hartl, Birgitta M. Wöhl, Jochen Bodem (2013): Foamy Virus Gag p71-p68 cleavage is required for template switch of the reverse transcriptase. *Journal of Virology* **87**: 7774-7776.

Ralf Spannaus und Jochen Bodem waren für die Klonierungen der Gag-Varianten, die PCR- Experimente und die Versuche in Zellkultur verantwortlich. Die *in vitro* Polymerisationstests der PR-RT mit dem p3-Peptid wurden von mir und Maximilian J. Hartl vorgenommen und ausgewertet. Birgitta M. Wöhl und Jochen Bodem waren für die Projektplanung verantwortlich und schrieben das Manuskript.

### **Einzelarbeit C**

Anna Schneider, Kristian Schweimer, Paul Rösch, Birgitta M. Wöhl (2015): AZT resistance alters enzymatic properties and creates an ATP-binding site in SFVmac reverse transcriptase. *Retrovirology* (im Druck); *Manuskript*.

Die Klonierungen und Reinigungen der SFVmac PR-RT und RTshort Varianten wurden von mir durchgeführt. Ich habe sämtliche Aktivitätstests, Tests zur Polymerisationstreue, Experimente zur RNase H-Aktivität und AZTMP-Ausbauxperimente mit den Proteinvarianten ausgearbeitet, vorgenommen und ausgewertet. Auch die Experimente und Berechnungen für die kinetischen Parameter der katalytischen Aktivität und des AZTMP-Ausbaus habe ich durchgeführt. Die NMR-Spektren von SFVmac RTshort Varianten mit und ohne ATP wurden von mir aufgenommen und ausgewertet. Kristian Schweimer unterstützte mich bei der Analyse der Spektren und der Bestimmung des  $K_D$ -Wertes für die ATP-Bindung in der AZT-resistenten SFVmac RTshort-*mt4*. Birgitta M. Wöhl konzipierte und betreute das gesamte Projekt. Paul Rösch unterstützte das Projekt finanziell und konzeptionell. Birgitta M. Wöhl, Kristian Schweimer und ich schrieben das Manuskript.

### **Einzelarbeit D**

Angela Corona<sup>§</sup>, Anna Schneider<sup>§</sup>, Kristian Schweimer, Paul Rösch, Birgitta M. Wöhl, Enzo Tramontano (2014): Inhibition of foamy virus reverse transcriptase by human immunodeficiency virus type 1 ribonuclease H inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**: 4086-4093.

<sup>§</sup>A. Corona and A. Schneider contributed equally to this work.

Angela Corona führte die Inhibitionsexperimente mit den unterschiedlichen Inhibitoren *in vitro* durch und bestimmte die  $IC_{50}$  Werte für die Inhibitoren. Die Reinigung der <sup>15</sup>N-markierten RNase H sowie die Titrationsexperimente mittels der NMR-Spektroskopie mit den Inhibitoren NSC657589, VU6 und RDS1643 wurden von mir vorgenommen. Ich habe die Daten der NMR-Experimente ausgewertet und für das RDS1643 eine potentielle Bindungstasche in der PFV RNase H bestimmt. Unter Berücksichtigung der NMR-Experimente konnte ich mit Hilfe des molekularen Docking-Programms *AutoDock Vina* die Bindung von RDS1643 in der PFV RNase H visualisieren und diese Informationen auf die HIV-1 RNase H übertragen. Kristian Schweimer unterstützte mich bei den NMR-Messungen und trug zur Diskussion der Ergebnisse bei. Paul Rösch unterstützte das Projekt finanziell und konzeptionell. Birgitta M. Wöhl und Enzo Tramontano konzipierten das Projekt und betreuten die Versuche. Das Manuskript wurde von Birgitta M. Wöhl und Enzo Tramontano und mir verfasst.

## 7 Einzelarbeit A

Anna Schneider, Daniel Peter, Jessica Schmitt, Berit Leo, Franziska Richter, Paul Rösch, Birgitta M. Wöhrl und Maximilian J. Hartl (2013): Structural requirements for enzymatic activities of foamy virus protease-reverse transcriptase. *Proteins* **83**: 375-385.



# Structural requirements for enzymatic activities of foamy virus protease-reverse transcriptase

Anna Schneider, Daniel Peter, Jessica Schmitt, Berit Leo, Franziska Richter, Paul Rösch, Birgitta M. Wöhrl,\* and Maximilian J. Hartl\*

Universität Bayreuth, Lehrstuhl Biopolymere, Universitätsstr. 30, D-95447 Bayreuth, Germany

## ABSTRACT

Reverse transcriptases (RTs) are pivotal in the life cycle of retroviruses and convert the genomic viral RNA into double-stranded DNA. The RT polymerase domain is subdivided into fingers, palm, thumb, and the connection subdomain, which links the polymerase to the C-terminal RNase H domain. In contrast to orthoretroviruses, mature RT of foamy viruses harbors the protease (PR) domain at its N-terminus (PR-RT). Therefore and due to low homology to other RTs, it is difficult to define the boundaries and functions of the (sub)domains. We introduced N- and C-terminal deletions into simian foamy virus PR-RT to investigate the impact of the truncations on the catalytic activities. Both, the RNase H domain and the connection subdomain contribute substantially to polymerase integrity and stability as well as to polymerase activity and substrate binding. The 42 amino acids long region C-terminal of the PR is important for polymerase stability and activity. PR activation *via* binding of PR-RT to viral RNA requires the presence of the full length PR-RT including the RNase H domain. *In vitro*, the cleavage efficiencies of FV PR for the Gag and Pol cleavage site are comparable, even though in virus particles only the Pol site is cleaved to completion suggesting that additional factors control PR activity and that virus maturation needs to be strictly regulated.

Proteins 2014; 82:375–385.  
© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** foamy virus; reverse transcriptase; retroviral protease; substrate binding; domain structure; enzyme activity.

## INTRODUCTION

Foamy viruses (FVs) are retroviruses but constitute a separate subfamily, the so-called *Spumaretrovirinae*. In contrast to members of the only other subfamily *Orthoretrovirinae*, they synthesize separate Gag and Pol proteins instead of a Gag-Pol fusion protein.<sup>1</sup> Pol harbors the viral enzymes protease (PR), reverse transcriptase (RT), and integrase (IN). As opposed to other retroviruses, FVs process Pol into mature PR-RT and IN proteins, that is, PR is not cleaved off from the RT<sup>2,3</sup> [Fig. 1(A)]. Nevertheless, FVs have to strictly control Pol cleavage during the viral life cycle to avoid untimely processing before virus assembly, since this would lead to noninfectious virus particles. The second FV PR cleavage site is located close to the C-terminus of the Gag p71 polyprotein separating the FV capsid protein p68 from p3, a 27 amino acid (aa) extension<sup>4</sup> [Fig. 1(A)], which was recently shown to be involved in template switching during reverse transcription.<sup>5</sup> While Pol processing in infectious virus particles is complete, Gag cleavage remains partial. In addition, FV p3 deletion mutants are able to

replicate, while FVs with an inactive Gag p68/p3 cleavage site are not, demonstrating the necessity for a tight control of PR activity during FV assembly and maturation.<sup>5–9</sup>

We have shown previously, that the isolated PR domain from simian FV from macaques (SFVmac) is a

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article

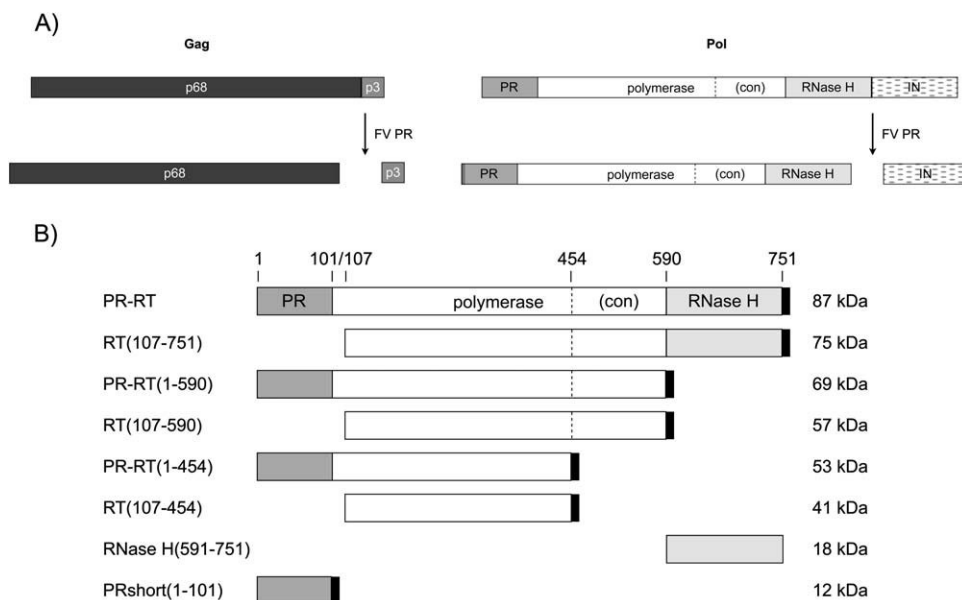
Abbreviations: FV, foamy virus; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; IN, integrase; MoMLV, Moloney murine leukemia virus; MPMV, Mason-Pfizer monkey virus; PARM, protease-activating RNA motif; PR, protease; RNase H, ribonuclease H; RT, reverse transcriptase; SFVmac, simian foamy virus from macaques.

Grant sponsor: Deutsche Forschungsgemeinschaft; Grant number: Wo630/7-3; Grant sponsor: Bavarian International Graduate School of Science (BIGSS), University of Bayreuth.

\*Correspondence to: Birgitta M. Wöhrl, Universität Bayreuth, Lehrstuhl Biopolymere, Universitätsstr. 30, D-95447 Bayreuth, Germany. E-mail: birgitta.woehr-l@uni-bayreuth.de or Maximilian J. Hartl, Universität Bayreuth, Lehrstuhl Biopolymere, Universitätsstr. 30, D-95447 Bayreuth, Germany. E-mail: maximilian.hartl@uni-bayreuth.de

Received 14 June 2013; Revised 30 July 2013; Accepted 9 August 2013  
Published online 22 August 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/prot.24394

**Figure 1**

Schematic overview of FV Gag and Pol processing and PR-RT constructs used. **A:** Processing of FV Gag and Pol precursor proteins. In contrast to orthoretroviruses there is only one PR cleavage in Gag and Pol, respectively. Processing of the FV Gag precursor protein leads to p68 and p3. Pol is cleaved between the RNase H and integrase (IN) domains resulting in a mature PR-RT and integrase. **B:** Schematic overview of the SFVmac PR-RT constructs and domain structure. SFVmac PR-RT comprises PR, polymerase, and RNase H domains. The connection (con) subdomain of the polymerase is shown as well. Boundaries between domains are represented as continuous and boundaries between subdomains as dashed lines. The exact amino acid number of the C-terminal end of each domain is depicted on top of the figure. The denominations of the used protein constructs are given on the left and the corresponding molecular masses on the right. The C-terminal  $6 \times$  His-tag is depicted as a black rectangle. (For detailed sequence information, see Supporting Information Fig. S1).

monomer of about 12 kDa, which has to dimerize to be active.<sup>3,10,11</sup> In the mature PR-RT, the PR is located N-terminally of the RT. PR-RT is also monomeric and dimerization of PR in the PR-RT context is achieved *via* specific binding of at least two PR-RT molecules to a region in the *pol* gene of the viral RNA, the so-called *protease activating RNA motif* (PARM), thus enabling the PR domains to form active homodimers.<sup>3,12,13</sup>

So far, crystal structures of the RTs from HIV-1 and HIV-2,<sup>14–16</sup> Moloney murine leukemia virus (MoMLV)<sup>17</sup> and xenotropic murine leukemia virus related virus (XMRV)<sup>18</sup> are available. The functional forms of HIV-1 and HIV-2 RTs are heterodimers. The larger subunit harbors an N-terminal polymerase domain and a C-terminal RNase H domain. Although the sequence of the small subunit is identical to the N-terminal region of the large subunit, its three-dimensional structure is different and it lacks the RNase H domain.<sup>14,15</sup> In contrast, MoMLV and the closely related XMRV RT are monomeric enzymes<sup>17,18</sup> and thus resemble FV RTs.<sup>12</sup> However, since the overall similarity of FV RTs to MoMLV or XMRV RT is below 25% (data not shown) and FV PR is not cleaved off from the RT, precise subdomain assignments are difficult. Nevertheless, it is widely assumed that the organization of the FV PR-RT is comparable to the PR and RT of other retroviruses. RTs consist of a C-terminal RNase H and an N-

terminal polymerase domain, which is divided into the subdomains fingers, thumb, palm and connection. The latter links the polymerase domain to the N-terminus of the RNase H.

Determination of the three-dimensional structures of SFVmac PR and PFV RNase H confirmed that, despite their low sequence homologies, high structural similarities in these regions are conserved throughout the family of retroviruses.<sup>10,19</sup> On the other hand, the two structures also demonstrated that the assumed FV PR-RT domain borders predicted by sequence alignments were incorrect.<sup>2</sup> Inaccurate determination of domain and subdomain borders can cause serious problems in the design and interpretation of *in vivo* as well as *in vitro* experiments. Therefore, in the absence of detailed structural data of the complete FV PR-RT, knowledge about its domain and subdomain organization is urgently needed. An important question regarding the domain organization of FV PR-RT is the function of the region aa 102–143, located between the C-terminus of the PR domain as defined by Hartl *et al.*<sup>10</sup> and the putative N-terminus of the RT according to Pfrepper *et al.*<sup>2</sup> Interestingly, monomeric MoMLV RT and mouse mammary tumor virus (MMTV RT) also carry N-terminal extensions of 39 and 30 aa, respectively,<sup>20,21</sup> and Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) RT harbors about 40 aa long glycine

rich region, the so called G-patch domain, at its N-terminus.<sup>22</sup> However, none of these regions exhibits significant homology to the region aa 102–143 of FV PR-RT. To date it has not been clarified, whether in FVs this peptide stretch is necessary for proper FV RT function, that is, whether it is part of the RT domain and important for accurate positioning of the PR to achieve PR dimerization in the PR-RT bound to *the protease-activating RNA motif* (PARM), or whether it solely represents a flexible linker connecting the two domains. Structural and functional data on SFVmac PR demonstrated that it is not an essential part of the PR domain.<sup>10</sup> Furthermore, based on mere sequence alignments with HIV-1 RT, identification of the junction between the polymerase and RNase H domains from prototype FV (PFV) and SFVmac has proven difficult.<sup>2</sup> The RNase H of FV is not cleaved off from PR-RT, whereas in the heterodimeric HIV-1 RT p66/p51 the RNase H domain is removed in the p51 subunit, thus defining the RNase H domain junction.<sup>19,23–25</sup>

To learn more about the structural features and enzymatic requirements of FV PR-RTs, we used the SFVmac PR-RT and designed C- and N-terminal PR-RT deletion mutants [Fig. 1(B)], which we subjected to enzymatic and structural investigations. Here, we identify functional domain and subdomain boundaries of SFVmac PR-RT as well as the intrinsic requirements for each of its enzymatic activities and for the structural integrity of the domains. Finally, we demonstrate that SFVmac PR does not discriminate between the Gag and Pol cleavage sites *in vitro*, although in the virus Pol is completely cleaved into PR-RT and IN, whereas the Gag p68/p3 cleavage is incomplete. Consequently, we hypothesize that in the viral context, complete cleavage is prevented by steric hindrance and/or additional factors<sup>5</sup> to control the correct sequence of events essential for virus maturation.

## MATERIALS AND METHODS

### Cloning, expression, and protein purification

SFVmac PR-RT<sup>26</sup> and PRshort<sup>10</sup> were prepared according to published purification protocols. In brief, SFVmac PR-RT contains a 6 × His-tag at the C-terminus which was used for purifying the protein via Ni-affinity chromatography (HisTrap, GE Healthcare, Munich, Germany) followed by chromatography over a heparin column (HiTrap heparin, GE Healthcare, Munich, Germany). The independent PRshort was also purified via a C-terminal His-tag by Ni-affinity chromatography. The His-tags of the two proteins were not removed. Purification and cleavage of the SFVmac GB1-RNase H (immunoglobulin binding domain B1 of the streptococcal protein G) fusion protein was performed as published previously for PFV RNase H.<sup>19,25</sup> The GB1-RNase H fusion protein harbors a 6 × His-tag at the N-terminus of GB1 and a tobacco etch virus (TEV)

protease cleavage site between the GB1 and RNase H domains. After purification via Ni-affinity chromatography GB1-RNase H was cleaved over night with TEV protease. The GB1 tag and the TEV protease were removed using a second Ni-affinity chromatography. The tagless RNase H was collected in the flow through.

The genes coding for the other PR-RT deletion variants included the sequence for a C-terminal 6 × His-tag. They were cloned into the vector pET101/D-TOPO (Invitrogen, Darmstadt, Germany) and expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta DE3 pLysSRARE (Novagen, Darmstadt, Germany) after the addition of 1 mM isopropylthiogalactoside (IPTG) at 37°C for 3 h (RT(107–751)), at 37°C for 4 h (PR-RT(1–590)), at 25°C for 4 h (PR-RT(1–454) and RT(107–454)) or 25°C for 16 h (RT(107–590)). Purification via HisTrap and heparin affinity chromatography was performed as published previously<sup>26</sup> and the His-tag was not removed. <sup>15</sup>N labeled proteins were purified accordingly, however, the bacterial strain was grown in M9 minimal medium<sup>27</sup> supplemented with trace solution TS2<sup>28</sup> and with (<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the only N-source.

### RNase H activity assays

The qualitative RNase H assay was performed as described previously with minor changes.<sup>19,25</sup> In a buffer containing 50 mM Tris/HCl, 80 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, and 0.5 mM EDTA, pH 7.0, 250 nM radioactively labeled DNA/RNA hybrid was incubated with 30 nM SFVmac PR-RT, 30 nM SFVmac RT(107–751), or 20 μM SFVmac RNase H at 25°C for the time periods indicated in the figure. Cleavage products were separated by denaturing gel electrophoresis (15% polyacrylamide, 8M urea) and quantified by densitometry using a phosphoimaging device (CR 35 Bio, raytest, Straubenhardt, Germany) and the software program AIDA (Image Analyzer v. 4.50).

Quantitative activity measurements were carried out with an RNA strand fluorescently labeled at the 3' end (5'-CCGAUCGCUCUCCUGGUGAUCCUUUCC-6-FAM) and hybridized to a DNA primer, which harbored a dabcyI quencher at its 5' end (5'-dabcyI-GGAAAGGAT-CACCAGGAGAG).<sup>25</sup> A total of 40 nM substrate was digested with 1 nM SFVmac PR-RT, 1 nM SFVmac RT(107–751), or 1.15 μM SFVmac RNase H in 50 mM Tris/HCl, 80 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.5 mM DTT, pH 8.0. The linear slope of the reaction progress curves were used to calculate the activity of the enzymes in pmol of cleaved substrate per 10 min per pmol enzyme.

### Fluorescence equilibrium titrations

Dissociation constants ( $K_d$ ) for DNA binding of the RTs were determined by fluorescence equilibrium titrations with a 24/40-mer DNA/DNA primer/template substrate (primer 5'-ATCACCAGGAGAGGGGAAAGCG

GA, template 5'-DY647-CTAATTCCGCTTTCCCCTCTCC TGGTGATCCTTTCCATCC) (biomers.net GmbH, Ulm, Germany) at 25°C as described previously.<sup>26</sup>  $K_d$ -values were calculated by nonlinear curve fitting to the anisotropy data with a two component binding equation.<sup>25</sup>

### Polymerization activity assays

Quantification of the RNA-dependent DNA polymerase activity was performed using a poly(rA)/oligo(dT)<sub>15</sub> substrate (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in a standard assay.<sup>26</sup> For qualitative analysis of the DNA-dependent DNA polymerase activity, a heteropolymeric single-stranded M13mp18 DNA (New England BioLabs, Frankfurt, Germany) was used as substrate. Reactions were performed as described previously.<sup>26</sup> Incubation times and enzyme concentrations were varied as indicated in the figures. Elongation products were separated by denaturing gel electrophoresis (10% polyacrylamide, 8M urea) and quantified as described above for the RNase H assays.

### Processivity assay

A total of 11 nM of a radioactively labeled 17-mer DNA primer (5'-P<sup>32</sup>-GTAAAACGACGGCCATG) (biomers.net; Ulm, Germany)<sup>26</sup> annealed to M13mp18 DNA (New England BioLabs, Frankfurt, Germany) were preincubated with 10 nM of enzyme in 50 mM Tris/HCl, 80 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, pH 7.7 for 2 min at 37°C. Reactions in a total volume of 10 µL were started by the addition of 250 µM dNTPs in presence or absence of 1 U/mL poly(rA)/oligo(dT)<sub>15</sub> as a competitor for the DNA substrate. The reaction was stopped after 10 min at 37°C by mixing the sample with 10 µL of stopping buffer (8M urea, 0.1% xylene cyanol, 0.1% bromophenol blue in 1× TBE). Polymerization products were separated by denaturing gel electrophoresis using 10% polyacrylamide/8M urea gels and quantified as described above.

### Initiation of polymerization

In a total volume of 10 µL, 20 nM radioactively labeled 30-mer DNA primer hybridized to a 50-mer DNA template (primer 5'-<sup>32</sup>P-GCTGTAATGGCGTCCC TGTTCCGGGCGCCTC, template 5'-GCTGTGGAAAATCT CATGCAGAGGGCCCCGAACAGGGACGCCATTACAGC) (IBA, Göttingen, Germany)<sup>26</sup> were incubated with 250 µM dNTPs for 2 min at 37°C in 50 mM Tris/HCl, 80 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.5 mM DTT, pH 7.7. The polymerization reaction was initiated by the addition of enzyme to a final concentration of 10 nM. Subsequently, samples were incubated for 15 min at 37°C and reactions stopped by adding 10 µL of stopping buffer (see above). Elongation products were analyzed by denaturing gel electrophoresis using 10% polyacrylamide/8M urea gels and quantified as described above.

### NMR analysis

[<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H] HSQC spectra were recorded for <sup>15</sup>N-labeled RT(107–590) and RT(107–454) at a sample temperature of 25°C. The samples contained 120 µM RT(107–590) in 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, 100 mM KCl and 10% D<sub>2</sub>O, or 100 µM RT(107–454) in 50 mM HEPES pH 7.4, 300 mM NaCl and 10% D<sub>2</sub>O. Temperature dependent 1D NMR spectra were measured with 50 µM RT(107–590) or RT(107–454) in 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, 100 mM KCl, and 10% D<sub>2</sub>O. All NMR experiments were recorded on a Bruker Avance 800 MHz spectrometer equipped with a cryo-probe. In-house protocols were used to process the NMR data.

### PR activity assay

PR activity assays were performed as described previously,<sup>10,12</sup> using a GB1-GFP cleavage substrate that harbored either the SFVmac Pol (ATQGSYVVH↓CNTTP) or the Gag (GENTDRSVN↓TVTAT) cleavage site between GB1 and the green fluorescent protein (GFP). In brief, 10 µM GB1-GFP substrate was incubated with 5 µM enzyme in 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM DTT, pH 6.4, 3M NaCl or alternatively 100 mM NaCl in combination with 0.5 µM PARM RNA for 16 h at 37°C. Cleavage products were analyzed by 19% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and quantified densitometrically.<sup>11</sup>

## RESULTS

### Protein variants

To analyze the domain structure and the intrinsic requirements of SFVmac PR-RT enzyme activities we constructed several C- and N-terminally deleted proteins [Fig. 1(B)] and analyzed their properties and activities. Previous studies have already shown that the first 101 aa are sufficient for PR activity in the presence of 3M NaCl [Fig. 1(B), PRshort].<sup>10</sup> However, from those data it was not clear, whether the region following the PR domain is required for polymerase and/or RNase H activities. We tested two different starting points for the polymerase: either after the PR domain at aa 107, or at aa 144 as suggested by Pfrepper *et al.*<sup>2</sup> Because of the hydrophobic character and solubility predictions of amino acids 102–106, they were disregarded in this study (Supporting Information Fig. S1). Enzymes starting at aa 144 were almost completely insoluble. In cases where marginal amounts of protein could be partially purified (i.e., RT(144–751)), no polymerization activity could be detected (data not shown), indicating a putative role of at least parts of the region aa 107–143 for integrity and functionality of the polymerase.

Similarly, to define the minimal length of the C-terminus required to sustain polymerase activity and PR



activation via PARM-RNA, several C-terminal deletion mutants were constructed. These mutants either lacked only the RNase H or the RNase H plus the connection subdomain. Based on sequence alignments with MoMLV or HIV-1 RT, aa 449 and aa 454, respectively, were tested as starting points for the connection domain. However, PR-RT(1–449) and RT(107–449) were completely insoluble after expression in *E. coli*. In contrast, PR-RT(1–454) and RT(107–454) could be obtained as soluble proteins.

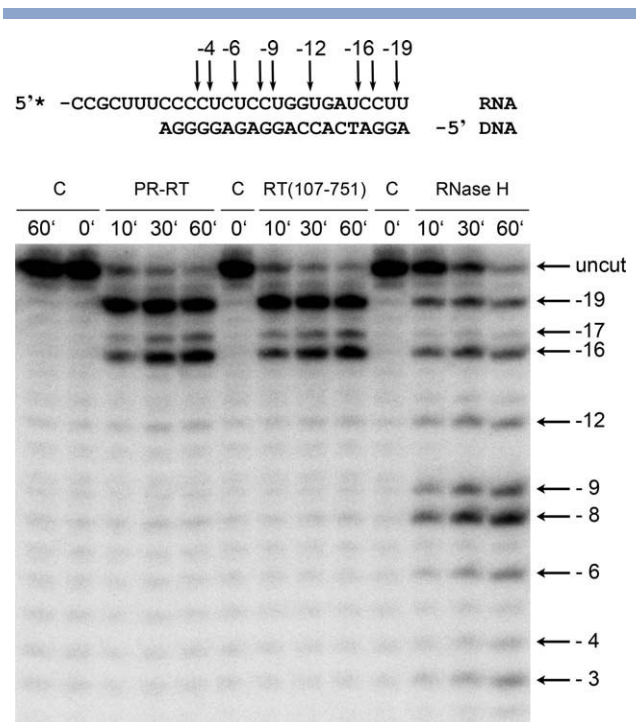
### RNase H activities

In a first set of experiments we determined whether the presence of the PR domain at the N-terminus has an effect on RNase H activities. Therefore, wild-type (wt) PR-RT, RT(107–751) lacking the PR domain and the isolated RNase H domain were analyzed in a qualitative RNase H assay. Although the separate RNase H domain from PFV still exhibits RNase H cleavage activity, it is severely reduced as compared to the wt PR-RT.<sup>19</sup> To achieve cleavage with the independent SFVmac RNase H domain, we used 20  $\mu\text{M}$  of RNase H as compared to 30 nM for the wt and for RT(107–751) (Fig. 2). wt and RT(107–751) exhibited comparable RNase H activities with identical cleavage sites (specified in the sequence on top of the gel). In contrast, the isolated RNase H domain cleaved the substrate indiscriminately in the hybrid region. This is due to nonspecific binding of one or more RNase H molecules, whereas binding and cleavage of the wt and RT(107–751) are directed by the 3'-OH end of the DNA-primer. Binding of the RT polymerase active site to the 3'-OH orients the RNase H at a distance of about 17–19 nt away from the 3'-OH end of the primer and endonucleolytic cleavage can take place in the RNA strand.<sup>25,29</sup>

Quantitative RNase H activity analysis with a fluorescently labeled substrate further indicated that the RNase H activities of the wt and the N-terminal deletion mutant RT(107–751) were comparable, whereas that of the isolated RNase H domain was roughly three orders of magnitude lower (Table I), owing to a reduced affinity for nucleic acid substrates.<sup>19</sup> This corresponds well to the about 1000-fold higher concentration of free RNase H used in the qualitative RNase H assay (Fig. 2).

### Binding affinities

Since changes in substrate affinities can have an impact on RNase H and polymerase enzyme activities we investigated the binding properties of the proteins with a fluorescently labeled DNA/DNA substrate. We performed enzyme titrations and used the change in fluorescence anisotropy to determine  $K_d$ -values (Table I, Supporting Information Fig. S2). Both, wt and RT(107–751) possessed similar substrate binding affinities with  $K_d$ -values of 6 nM and 3 nM, respectively, indicating that the PR



**Figure 2**

Qualitative RNase H activities of different SFVmac PR-RT deletion variants. The 20/27 mer DNA/RNA primer/template substrate, 5' end-labeled at the RNA strand with  $^{32}\text{P}$ , is presented on top of the figure. Each enzyme (30 nM wt PR-RT, 30 nM RT(107–751), and 20  $\mu\text{M}$  free RNase H) was incubated with 250 nM substrate at 25°C for the times shown on top of the gel. Cleavage products were separated on a 15% sequencing gel and visualized by phosphorimaging. Arrows and numbers indicate the cleavage sites identified on the gel. The first nucleotide of the RNA hybridized to the 3'-OH nucleotide of the DNA strand is designated –1. C: control reactions were performed in the absence of enzyme for 0 and 60 min.

domain is not involved in binding of nucleic acid substrates, neither directly nor indirectly (Table I, Supporting Information Fig. S2A). However, deletion of the RNase H domain, either in the presence or absence of the PR domain, resulted in about 90% reduction of affinity with PR-RT(1–590) or RT(107–590) (Table I, Supporting Information Fig. S2B). Further deletion of the connection subdomain (=PR-RT(1–454) and RT(107–454)) led to an additional decrease of affinity (Table I, Supporting Information Fig. S2C). Thus, the RNase H domain and the connection subdomain—but not the PR domain—of SFVmac PR-RT are important for high-affinity substrate binding.

### Polymerization and processivity

To analyze the polymerization properties of the enzymes we performed qualitative polymerization assays on a single-stranded heteropolymeric M13 substrate. RT(107–454) and PR-RT(1–454) exhibited very little polymerization activity and even after 10 min only very

**Table I**  
Kinetic Parameters of RNase H and Polymerization Activities

Enzyme	RNase H activity ( $\frac{\text{pmol}}{10 \text{ min} \times \text{pmol enzyme}}$ )	Polymerization activity ( $\frac{\text{U}}{\text{nmol enzyme}}$ )	Dissociation constant, $K_d$ (nM)
PR-RT	6.1	505	6 ( $\pm$ 1)
RT(107–751)	4.7	244	3 ( $\pm$ 1)
PR-RT(1–590)	—	206	54 ( $\pm$ 7)
RT(107–590)	—	147	37 ( $\pm$ 4)
PR-RT(1–454)	—	$243 \times 10^{-3}$	200 ( $\pm$ 6)
RT(107–454)	—	$224 \times 10^{-3}$	213 ( $\pm$ 13)
RNase H(591–751)	$2.1 \times 10^{-3}$	—	—

RNase H activities are based on a fluorescence assay<sup>25</sup> and given as pmol of converted substrate in 10 min at 25°C per pmol enzyme. Cleavage rates were calculated using the linear slope of the reaction progress curve. DNA polymerization activities are given in units (U) per nmol enzyme, where 1 U catalyzes the incorporation of 1 nmol TTP in poly(rA)/oligo(dT)<sub>15</sub> in 10 min at 37°C. Dissociation constants were determined by fluorescence anisotropy using a 24/40 mer DNA/DNA substrate labeled at the 5'-end of the 40mer with DY547.

short elongation products (8 nt) were visible [Fig. 3(A), Lanes 1 and 2]. After one min most elongations stopped at +1. A tenfold increase of the enzyme concentration yielded detectable amounts of extension products of up to 75 nt, another tenfold increase of enzyme resulted in even longer products. All other enzymes tested were much more active and synthesized extension products of 300–700 nt, already at an enzyme concentration of 70 nM. However, none of the PR-RT deletion mutants exhibited polymerization activity comparable to the wt enzyme [Fig. 3(A), Lane 6], suggesting that deletions either at the C- or N-terminus disturb the structural integrity of the proteins. This was also noticeable with RT(107–751) only lacking the PR domain [Fig. 3(A), Lane 4], although this domain is not involved in nucleic acid binding. Most enzymes produced strong stop bands below the 25 nt marker, that is, within the first 8 nt of extension, suggesting that they have to overcome an initiation phase to polymerize processively.

The processivity of a DNA polymerase is defined as the length of polymerization products synthesized during one round of binding and polymerization without any dissociation/re-association step. To further examine processivity, we performed polymerization assays at very low enzyme concentrations (10 nM) on the M13 substrate in the presence of excess competitor substrate to prevent re-association [Fig. 3(B), left panel]. At these enzyme concentrations, polymerization products were not visible in the presence of competitor with RT(107–454) and PR-RT(1–454) (Lanes 1 and 2). Both, RT(107–590) and RT(107–751) [Fig. 3(B), Lanes 3 and 4] were less processive than PR-RT(1–590) and the wt PR-RT [Fig. 3(B), Lanes 5 and 6], so that again, deletion of the PR domain appears to lead to some minor structural changes in the RT that influence its stability and/or polymerization behavior. More importantly, in the

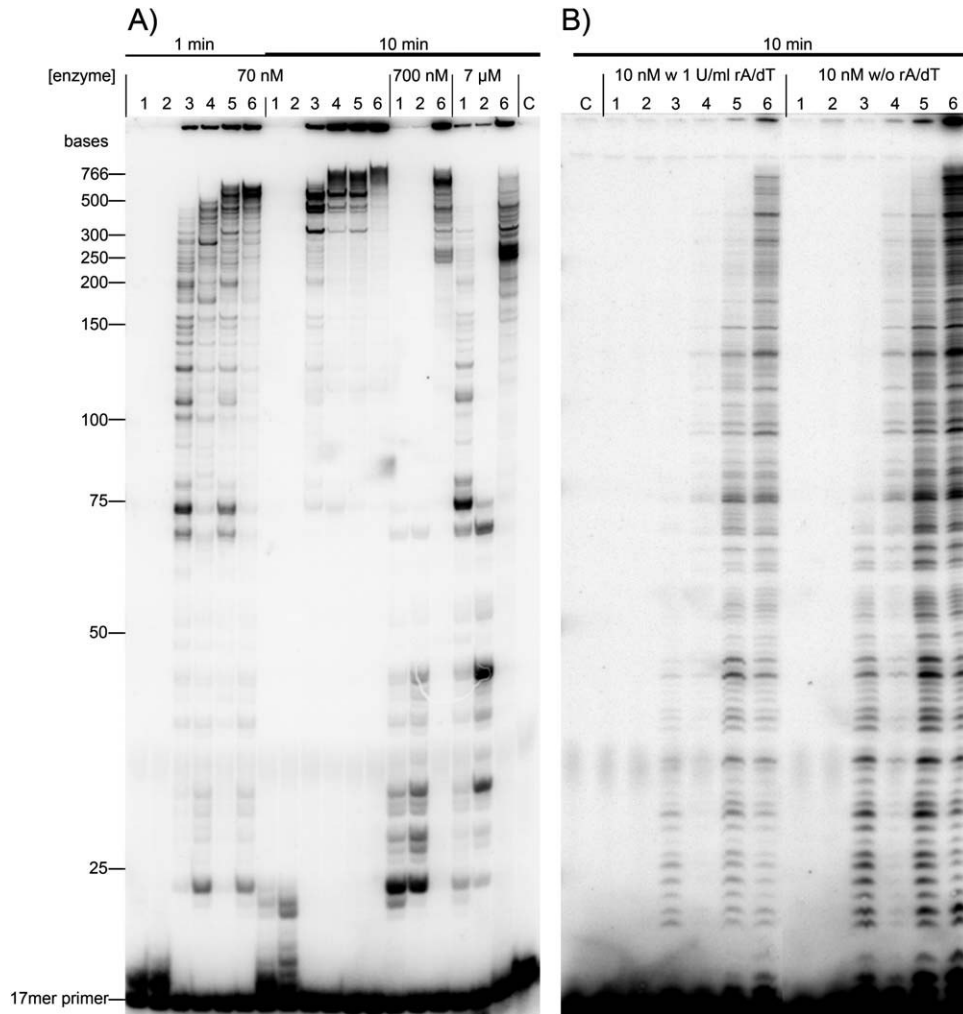
absence of competitor, even for the wt protein, a major band was visible after the extension of only +1 nt or +2 nt [Fig. 3(B), right panel]. Quantification of the wt PR-RT polymerization products revealed that around 50% are +1 nt and +2 nt extension products, supporting our notion that the enzymes have to overcome a polymerization initiation state before transition into the processive phase takes place.

To study the incorporation of the first few nucleotides in more detail, we used a 30/50 mer DNA/DNA primer-template substrate, which allowed a more precise separation of the short extension products created during the initiation phase (Fig. 4). As before, RT(107–454) and PR-RT(1–454), both lacking the connection and RNase H domains, produced no extension products under the conditions tested in this assay (Fig. 4, Lanes 1 and 2). Although all other enzymes exhibited polymerization activity, mainly short extension products of +1 to +4 nt were synthesized, with a particularly strong band at +4 nt. The wt protein managed to overcome this strong pause site and to extend a considerable proportion of substrate to the end of the template. Remarkably, there were no further stops after the extension of 10 nt (Fig. 4, Lane 6), in good agreement with the results for the wt enzyme [Fig. 3(A), Lane 6].<sup>12</sup> Since the sequences of the M13 substrate (Fig. 3) and the substrate used in Figure 4 are not homologous, we conclude that these stops are sequence independent. Therefore, we suggest that, after incorporation of a few nucleotides, the enzyme needs to undergo a conformational change to switch to the elongation phase, which finally results in processive polymerization.

### Structural integrity and thermal stability studied by NMR spectroscopy

By analyzing the enzymatic activities and binding affinities of the deletion mutants we were able to determine the domain and subdomain borders. We could demonstrate that the two smallest constructs RT(107–454) and RT(107–590) were still able to polymerize, although with reduced activities (Table I, Fig. 4). To get some structural data on these enzymes, we recorded [<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H] HSCQ NMR spectra of the <sup>15</sup>N labeled RTs [Fig. 5(A,B)]. The spectra of the two enzymes revealed well dispersed signals between 6.5 and 9.5 ppm, indicative of folded proteins with a defined tertiary structure. However, due to the size of the proteins the signals overlap and signal intensities are inhomogeneous.

To determine the stability of the two enzymes, we performed 1D-<sup>1</sup>H NMR experiments at different temperatures ranging from 15°C up to 40°C [Fig. 5(C,D)]. As expected, RT(107–590) still harboring the connection subdomain was more stable than RT(107–454) [Fig. 5(C,D)]. A strong signal decrease could be observed with RT(107–454) when increasing the temperature from 30



**Figure 3**

Polymerization properties. **A:** Time dependent primer extension using varying enzyme concentrations. DNA dependent polymerization reactions with 10 nM single-stranded M13 DNA were performed at 37°C. Reactions were started by the addition of enzyme (Lane 1: RT(107-454), Lane 2: PR-RT(1-454), Lane 3: RT(107-590), Lane 4: RT(107-751), Lane 5: PR-RT(1-590), Lane 6: wt PR-RT) and stopped at the time points depicted on top. DNA size markers are indicated on the left. **C:** control reactions without enzyme. **B:** Processivity assay. Primer elongations with 10 nM of enzyme are shown in presence (w rA/dT) and absence (w/o rA/dT) of the competitor poly(rA)/oligo(dT)<sub>15</sub>, respectively. Labeling of lanes as in (A).

to 35°C, whereas with RT(107-590) a similar decrease was only visible at 40°C. This signal loss is probably due to protein unfolding and irreversible aggregation. Figure 6 also suggests that the size and instability of the proteins at elevated temperatures impedes structure determination by NMR.

These results are in good agreement with the data presented in Table I. In summary, they demonstrate that the connection subdomain plays an important role in high-affinity substrate binding and polymerization and, in addition, contributes significantly to the stability of FV RTs.

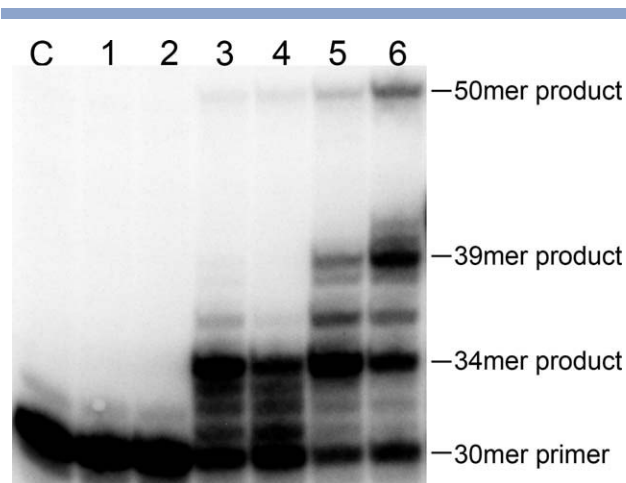
### Protease activity

Regulation of PR activity in FVs is distinct from that of other known retroviruses.<sup>12</sup> PR activation is achieved

by binding of at least two PR-RT molecules to the PARM on the viral RNA, which results in dimerization of two PR domains. Only then cleavage can occur. *In vitro*, dimerization in the absence of PARM can also be attained using buffers containing 2–3M NaCl. The high ionic strength of the buffer appears to promote hydrophobic interactions of the PR domains.

*In vivo*, two PR cleavage sites have been determined: one in Pol, leading to PR-RT and IN proteins, the other one at the C-terminus of the Gag p71 precursor giving rise to the products p68 and p3. However, analysis of the protein composition of virus particles demonstrated that in FVs Gag cleavage is only partial, whereas Pol is processed completely into PR-RT and IN.<sup>6–9</sup>

Therefore, we wanted to determine, whether *in vitro* one of the two cleavage sites is preferred and cleaved

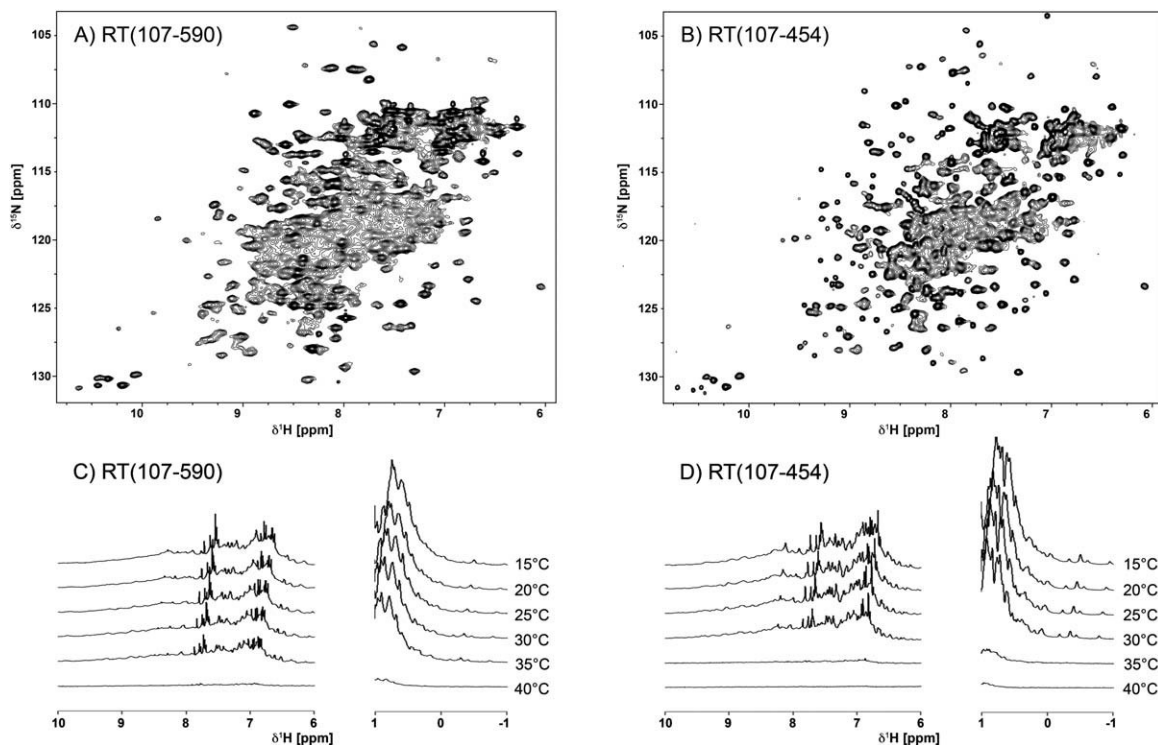


**Figure 4**

Efficiency of the initiation of polymerization. Reactions were carried out at 37°C for 15 min with 20 nM primer/template and 10 nM RT on a 30/50 mer DNA/DNA primer/template. Lane 1: RT(107-454), Lane 2: PR-RT(1-454), Lane 3: RT(107-590), Lane 4: RT(107-751), Lane 5: PR-RT(1-590), Lane 6: wt PR-RT, C: control reaction without enzyme.

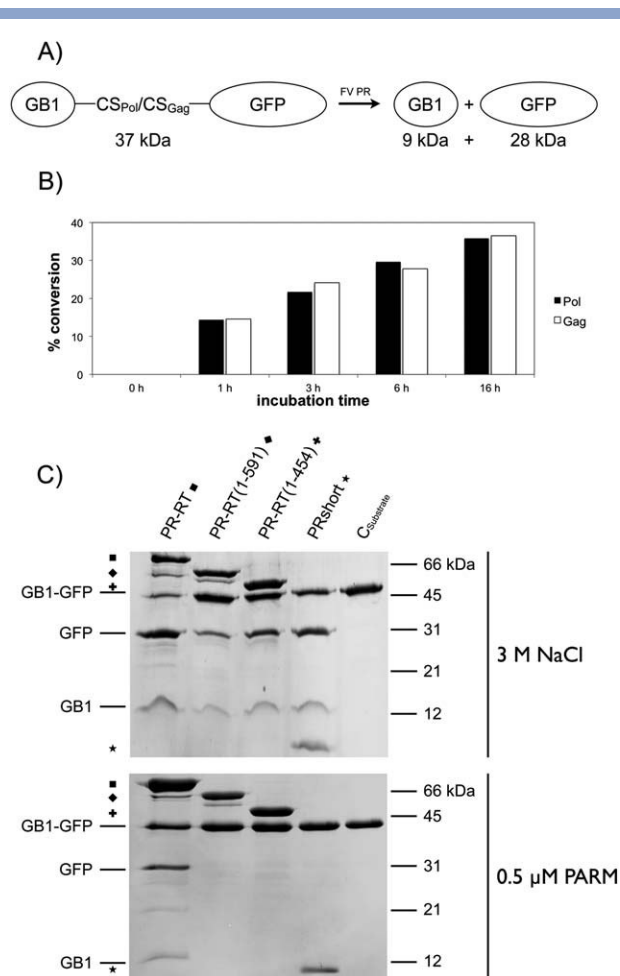
with higher efficiency by wt PR-RT. Two substrates were used, containing either the natural Gag or Pol cleavage site between the proteins GB1 and GFP [Fig. 6(A)]. A time course experiment with the two substrates in the presence of the PR-activating PARM RNA showed no significant differences in cleavage efficiencies for the two substrates suggesting similar substrate affinities [Fig. 6(B)]. Apparently, other regulatory factors interfere with Gag *in vivo* cleavage.

Finally, we wanted to identify regions of the PR-RT important for PR activation by PARM. Since no differences in substrate preference were detected, we used the Pol cleavage site containing construct for analysis. The PR activities of the C-terminal deletion mutants PR-RT(1-590), lacking the RNase H domain, and PR-RT(1-454), additionally lacking the connection subdomain were tested in the presence of 3M NaCl or in the presence of PARM [Fig. 6(C)] and compared to the wt enzyme and PRshort. Analysis at 3M NaCl showed the PR domain of the deletion mutants to be functional and comparable to the wt PR-RT or the isolated PR domain [Fig. 6(C), upper panel]. However, PR activity of the two deletion mutants as well as PRshort was completely abolished in the presence of PARM and low NaCl



**Figure 5**

Tertiary structure analysis and thermal stability of SFVmac RT(107-590) and RT(107-454). [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ] HSQC spectra of 120  $\mu\text{M}$  RT(107-590) (A) and 100  $\mu\text{M}$  RT(107-454) (B) at 25°C in 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4, 100 mM KCl, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  and in 50 mM HEPES pH 7.4, 300 mM NaCl and 10%  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperature dependent  $^1\text{H}$  spectra of 50  $\mu\text{M}$  RT(107-590) (C) and RT(107-454) (D) in 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4 100 mM KCl, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ . All measurements were performed with a Bruker DRX 800 MHz spectrometer.



**Figure 6**

Protease activity assays. **A:** Scheme of the polymerization assays. The substrates containing either the SFVmac Pol or Gag cleavage site (CS) between GB1 and GFP are cleaved into the products GB1 and GFP by an active SFVmac PR. **B:** Time dependent decrease of substrate GB1-CS<sub>Pol</sub>-GFP (black) or GB1-CS<sub>Gag</sub>-GFP (white) catalyzed by SFVmac PR-RT in the presence of 0.5 μM PARM and 100 mM NaCl. **C:** Activity assay with different SFVmac PR-RTs and the GB1-CS<sub>Pol</sub>-GFP substrate. A total of 10 μM of GB1-CS<sub>Pol</sub>-GFP were incubated with 5 μM of the enzyme depicted on top in the presence of 3M NaCl (upper panel) or 0.5 μM PARM and 100 mM NaCl (lower panel). Reaction products were separated by 19% SDS-PAGE. C<sub>Substrate</sub>: uncleaved substrate. The sizes of the standard proteins are shown on the right. The positions of the FV enzymes in the gel are labeled on the right using the same symbols as indicated on top of the gel.

concentrations [Fig. 6(C), lower panel]. These results show that the structural integrity of the complete PR-RT enzyme is essential for proper high-affinity binding to PARM to initiate PR cleavage.

## DISCUSSION

FVs are the most ancient retroviruses known.<sup>30</sup> Their unique replication strategy and particle organization sets them apart from all other retroviruses.<sup>31–33</sup> However,

compared to other retroviruses like HIV-1, detailed and thorough molecular and structural data on FV proteins are scarce and, owing to low sequence homologies, transfer of, for example, structural data from well-characterized systems to FVs is challenging and often unreliable. Strikingly, in FVs the complete PR domain is attached to the N-terminus of the RT, resulting in a mature PR-RT enzyme,<sup>2,3</sup> a protein unknown in other retroviruses.

Several attempts have been made to identify and characterize the domain and subdomain organization of FV PR-RT, but were hampered because the predicted PR cleavage sites and thus domain junctions were not precise.<sup>2</sup> Moreover, PR-RT variants were insoluble, and the influence of deletions on the enzyme's stability and integrity restricted the use of deletions variants in *in vivo* experiments.<sup>34</sup> Similar experience was gained with an independent FV PR domain with an extended C-terminus, PR(1–143), which resulted in PR oligomerization and thus artificial PR activation.<sup>2,10</sup>

Here, we studied proteolytic cleavage, DNA synthesis and RNA hydrolysis to identify domain and subdomain junctions aiming at the construction of functional PR-RT variants for *in vivo* and structural biology work (Fig. 1, Supporting Information Fig. S1). The junctions identified are not absolute, but nevertheless provide possible (sub)domain borders that result in functional proteins that are still structured and harbor enzyme activity.

Since the RNase H domain follows the connection subdomain and we have previously solved the structure of the free RNase H domain of PFV,<sup>19,25</sup> we used the information of the N-terminal start site of the free RNase H to define the C-terminus of the connection subdomain in the full-length RT. Deletion of the RNase H domain resulted in a tenfold higher  $K_d$ -value (Table I, Supporting Information Fig. S2) for primer/template binding and in a decrease in enzymatic activity and processivity of the RNase H deletion variants, PR-RT(1–590) and RT(107–590) (Fig. 3).

The consequence of removing the connection subdomain in addition to the RNase H domain was a further decrease in primer/template binding (ca. 100-fold, Table I, Supporting Information Fig. S2) and a dramatic decline in polymerization capability. Elimination of the connection subdomain had a serious impact on the structural integrity of the polymerase domain (Fig. 5), suggesting that the proper protein fold was destabilized. In particular, the initiation process of polymerization and the transition to elongation appeared to be severely impaired (Figs. 3 and 4). Our studies imply that the transition from initiating polymerization at a primer to elongation is a critical step during DNA synthesis, even for the wt enzyme (Figs. 3 and 4). Apparently, this process is not dependent on the sequence or structure of the substrate since we used two different substrates in the experiments of Figures 3 and 4 that do not share

sequence homology in the template sequence following the primer binding site. Comparable to HIV-1 RT, the connection subdomain appears to fulfill a more complex role than just linking the polymerase to the RNase H domain. Amino acid exchanges in the connection subdomain of HIV-1 RT impair its RNase H activity, increase the polymerase processivity and make a contribution to resistance against nucleoside and non-nucleoside RT inhibitors.<sup>35–37</sup>

Nevertheless, RT(107–454) exhibits a well-defined three-dimensional structure [Fig. 5(B)] and residual enzymatic activity (Table I, Fig. 3). Thus, it can be defined as the smallest active FV polymerase and can be employed in future investigations, that is, to study structural features of azidothymidine (AZT) resistant SFVmac PR-RTs by NMR or X-ray crystallography, because all the resistance mutations are located in this residual polymerase domain.<sup>26,38</sup>

The N-terminal deletions demonstrate that the region aa 107–143, located adjacent to the C-terminus of the PR, is probably not just a linker connecting the PR and RT but an intrinsic part of the RT domain, necessary for RT solubility and integrity and possibly for proper PR positioning. Deletion of the PR domain (aa 1–106) does not substantially influence substrate binding or polymerization activities [Table I, Fig. 3(A), Lanes 4 and 6, 10 min]. From our data, we propose that in FV PR-RT the region aa 107–143 folds back onto the RT domain and thus locks the PR into a certain orientation which facilitates PR dimerization upon binding of the RT to the PARM RNA.

Our results on PR activity suggest that the entire RT including the RNase H domain is needed for proper binding to the PARM RNA and thus PR activation. Upon deletion of the RNase H domain (PR-RT(1–590) and PR-RT(1–454)), PR activation via PARM binding was completely abrogated although the PR domain was intact, as demonstrated by activation of PR *via* 3M NaCl [Fig. 6(C)]. PR inactivation by RNase H deletion is probably due to a substantial decrease in the affinity for nucleic acids of those mutants (Table I).

Surprisingly, although in viruses PR cleavage of Gag but not Pol, is incomplete,<sup>6–9</sup> our experiments using the natural Gag and Pol cleavage sites reveal the same cleavage efficiency for the two substrates at a twofold substrate excess *in vitro*, indicating similar  $K_d$ -values. Here, we solely measured the affinity of the PR for the cleavage sites, since the adjacent amino acids and domains are identical in our substrates [Fig. 6(A)]. In the virus, there is a 1:1 ratio of substrate to PR enzyme for Pol processing, whereas Gag is present in large excess. Provided, the affinity for both substrates is the same, the excess of Gag leads to a saturation state for Gag binding to PR and thus should thin out Pol as a substrate. As a consequence complete Pol cleavage would be prevented. The fact, that in the virus the situation is the other way round, that is,

complete Pol but incomplete Gag cleavage is observed, implies that cleavage of Gag is somehow circumvented during virus assembly or maturation. We have shown previously that partial Gag processing is required for the first template switch during reverse transcription.<sup>5</sup> Thus, we conclude that *in vivo* during virus maturation, the Gag p68/p3 cleavage site is less accessible than the Pol RT/IN site, leading to delayed and therefore only partial Gag cleavage. Bound pregenomic viral RNA or the Gag p71 folding topology might be the cause for steric hindrance. We postulate, that this slowdown is a regulatory feature to control the precise order of events during virus assembly and maturation since the virus has to guarantee that IN is cleaved off from Pol before reverse transcription starts to be able to create active IN tetramers.<sup>5,39</sup> These are required in the next round of infection to integrate the double-stranded DNA into the host genome. Premature start of the reverse transcription process will result in destruction of the PARM secondary structure required for PR activity and thus noninfectious virus. However, at least some of the Gag molecules have to be cleaved to obtain infectious virus particles.<sup>6,40</sup>

In summary, we demonstrate an essential role for region aa 107–143 for polymerase but not protease activity, whereas the connection subdomain is important for substrate affinity, protein stability and proper function of the RT. Furthermore, our data on PR activation show that the full length PR-RT including the RNase H domain is required for PR activity.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ramona Heissmann for excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Löchelt M, Flügel RM. The human foamy virus pol gene is expressed as a Pro-Pol polyprotein and not as a Gag-Pol fusion protein. *J Virol* 1996;70:1033–1040.
2. Pfrepper KI, Rackwitz HR, Schnölzer M, Heid H, Löchelt M, Flügel RM. Molecular characterization of proteolytic processing of the Pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease. *J Virol* 1998;72:7648–7652.
3. Hartl MJ, Bodem J, Jochheim F, Rethwilm A, Rösch P, Wöhrl BM. Regulation of foamy virus protease activity by viral RNA—a novel and unique mechanism among retroviruses. *J Virol* 2011;85:4462–4469.
4. Pfrepper KI, Löchelt M, Rackwitz HR, Schnölzer M, Heid H, Flügel RM. Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus. *J Virol* 1999;73:7907–7911.
5. Spannaus R, Schneider A, Hartl M, Wöhrl BM, Bodem J. Foamy viral Gag p71-p68 cleavage is required for template switch of the reverse transcriptase. *J Virol* 2013;87:7774–7776.
6. Enssle J, Fischer N, Moebe A, Mauer B, Smola U, Rethwilm A. Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J Virol* 1997;71:7312–7317.
7. Zemba M, Wilk T, Rutten T, Wagner A, Flügel RM, Löchelt M. The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus Gag

- precursor is required for efficient virus infectivity. *Virology* 1998; 247:7–13.
8. Baldwin DN, Linial ML. Proteolytic activity, the carboxy terminus of Gag, and the primer binding site are not required for Pol incorporation into foamy virus particles. *J Virol* 1999;73:6387–6393.
  9. Swiersy A, Wiek C, Reh J, Zentgraf H, Lindemann D. Orthoretroviral-like prototype foamy virus Gag-Pol expression is compatible with viral replication. *Retrovirology* 2011;8:66.
  10. Hartl MJ, Wöhrl BM, Rösch P, Schweimer K. The solution structure of the simian foamy virus protease reveals a monomeric protein. *J Mol Biol* 2008;381:141–149.
  11. Hartl MJ, Schweimer K, Reger MH, Schwarzinger S, Bodem J, Rösch P, Wöhrl BM. Formation of transient dimers by a retroviral protease. *Biochem J* 2010;427:197–203.
  12. Hartl MJ, Mayr F, Rethwilm A, Wöhrl BM. Biophysical and enzymatic properties of the simian and prototype foamy virus reverse transcriptases. *Retrovirology* 2010;7:5.
  13. Spannaus R, Hartl MJ, Wöhrl BM, Rethwilm A, Bodem J. The prototype foamy virus protease is active independently of the integrase domain. *Retrovirology* 2012;9:41.
  14. Huang HF, Chopra R, Verdine GV, Harrison SC. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug design. *Science* 1998;282:1669–1675.
  15. Ding J, Das K, Hsiou Y, Sarafianos SG, Clark ADJ, Jacobo-Molina A, Tantillo C, Hughes SH, Arnold E. Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1998;284:1095–1111.
  16. Ren J, Bird LE, Chamberlain PP, Stewart-Jones GB, Stuart DI, Stammers DK. Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14410–14415.
  17. Das D, Georgiadis MM. The crystal structure of the monomeric reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus. *Structure* 2004;12:819–829.
  18. Nowak E, Potrzebowski W, Konarev PV, Rausch JW, Bona MK, Svergun DI, Bujnicki JM, Le Grice SF, Nowotny M. Structural analysis of monomeric retroviral reverse transcriptase in complex with an RNA/DNA hybrid. *Nucleic Acids Res* 2013;41:3874–3887.
  19. Leo B, Schweimer K, Rösch P, Hartl MJ, Wöhrl BM. The solution structure of the prototype foamy virus RNase H domain indicates an important role of the basic loop in substrate binding. *Retrovirology* 2012;9:73.
  20. Roth MJ, Tanese N, Goff SP. Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1985;260:9326–9335.
  21. Entin-Meer M, Avidan O, Hizi A. The mature reverse transcriptase molecules in virions of mouse mammary tumor virus possess protease-derived sequences. *Virology* 2003;310:157–162.
  22. Krizova I, Hadravova R, Stokrova J, Gunterova J, Dolezal M, Ruml T, Rumlova M, Pichova I. The G-patch domain of Mason-Pfizer monkey virus is a part of reverse transcriptase. *J Virol* 2012;86:1988–1998.
  23. di Marzo Veronese F, Copeland TD, DeVico AL, Rahman R, Oroszlan S, Gallo RC, Sarngadharan MG. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* 1986;231:1289–1291.
  24. Hansen J, Schulze T, Mellert W, Moelling K. Identification and characterization of HIV-specific RNase H by monoclonal antibody. *EMBO J* 1988;7:239–243.
  25. Leo B, Hartl MJ, Schweimer K, Mayr F, Wöhrl BM. Insights into the structure and activity of prototype foamy virus RNase H. *Retrovirology* 2012;9:14.
  26. Hartl MJ, Kretzschmar B, Frohn A, Nowrouzi A, Rethwilm A, Wöhrl BM. AZT resistance of simian foamy virus reverse transcriptase is based on the excision of AZTMP in the presence of ATP. *Nucleic Acids Res* 2008;36:1009–1016.
  27. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning—a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994.
  28. Meyer O, Schlegel HG. Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1983;37:277–310.
  29. Kirby KA, Marchand B, Ong YT, Ndongwe TP, Hachiya A, Michailidis E, Leslie MD, Sietsema DV, Fetterly TL, Dorst CA, Singh K, Wang Z, Parniak MA, Sarafianos SG. Structural and inhibition studies of the RNase H function of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2048–2061.
  30. Switzer WM, Salemi M, Shanmugam V, Gao F, Cong ME, Kuiken C, Bhullar V, Beer BE, Vallet D, Gautier-Hion A, Tooze Z, Villinger F, Holmes EC, Heneine W. Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature* 2005;434:376–380.
  31. Linial ML. Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol* 1999;73:1747–1755.
  32. Yu SF, Baldwin DN, Gwynn SR, Yendapalli S, Linial ML. Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* 1996;271:1579–1582.
  33. Rethwilm A. Molecular biology of foamy viruses. *Med Microbiol Immunol* 2010;199:197–207.
  34. Kögel D, Aboud M, Flügel RM. Molecular biological characterization of the human foamy virus reverse transcriptase and ribonuclease H domains. *Virology* 1995;213:97–108.
  35. Julius JG, McWilliams MJ, Sarafianos SG, Alvord WG, Arnold E, Hughes SH. Mutation of amino acids in the connection domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that contact the template-primer affects RNase H activity. *J Virol* 2003; 77:8548–8554.
  36. Menendez-Arias L, Betancor G, Matamoros T. HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain mutations involved in resistance to approved non-nucleoside inhibitors. *Antiviral Res* 2011;92:139–149.
  37. Ehteshami M, Beilhartz GL, Scarth BJ, Tchesnokov EP, McCormick S, Wynhoven B, Harrigan PR, Götte M. Connection domain mutations N348I and A360V in HIV-1 reverse transcriptase enhance resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine through both RNase H-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2008;283: 22222–22232.
  38. Kretzschmar B, Nowrouzi A, Hartl MJ, Gärtner K, Wiktorowicz T, Herchenröder O, Kanzler S, Rudolph W, Mergia A, Wöhrl B, Rethwilm A. AZT-resistant foamy virus. *Virology* 2008;370:151–157.
  39. Roy J, Linial ML. Role of the foamy virus Pol cleavage site in viral replication. *J Virol* 2007;81:4956–4962.
  40. Konvalinka J, Löchelt M, Zentgraf H, Flügel RM, Kräusslich H-. Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polypeptide. *J Virol* 1995;69:7264–7268.





## Supplementary Information

### Figure S1

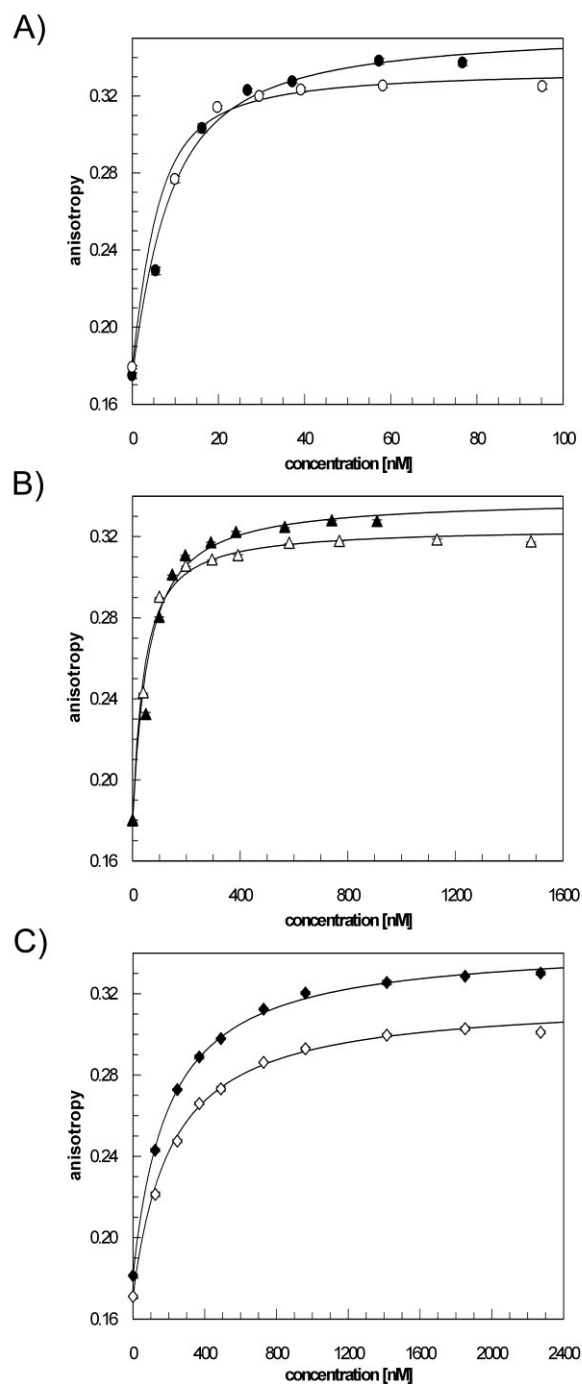
```

1  MDPLQ LLQPL EAEIK GTKLK AHWDS GATIT CVPEA FLEDE RPIQT MLIKT
51 IHGEK QQDVY YLTFK VQGRK VEAEV LASPY DYILL NPSDV PWLMK KPLQL
101 TVLVP LHEYQ ERLLQ QTALP KEQKE LLQKL FLKYD ALWQH WENQV GHRRI
151 KPHNI ATGTL APRPQ KQYPI NPKAK PSIQI VIDDL LKQGV LIQQN STMNT
201 PVYPV PKPDG KWRMV LDYRE VNKII PLIAA QNQHS AGILS SIYRG KYKTT
251 LDLTN GFWAH PITPE SYWLT AFTWQ GKQYC WTRLP QGFLN SPALF TADV
301 DLLKE IPNVQ AYVDD IYISH DDPQE HLEQL EKIFS ILLNA GYVVS LKKSE
351 IAQRE VEFLG FNITK EGRGL TDTFK QKLLN ITPPK DLKQL QSILG LLNFA
401 RNFIP NYSEL VKPLY TIVAN ANGKF ISWTE DNSNQ LQHII SVLNQ ADNLE
451 ERNPE TRLII KVNSS PSAGY IRYYN EGSKR PIMYV NYIFS KAEAK FTQTE
501 KLLTT MHKGL IKAMD LAMGQ EILVY SPIVS MTKIQ RTPLP ERKAL PVRWI
551 TWMTY LEDPR IQFHY DKSLP ELQQI PNVTE DVIK TKHPS EFAMV FYTDG
601 SAIKH PDVNK SHSAG MGIAQ VQFIP EYKIV HQWSI PLGDH TAQLA EIAAV
651 EFACK KALKI SGPVL IVTDS FYVAE SANKE LPYWK SNGFL NNKKK PLRHV
701 SKWKS IAACL QLKPD IIIMH EKGHQ QPMTT LHTEG>NNLAD KLATQ GSYVV
751 H

```

**Figure S1: Domain organization of SFVmac PR-RT.** The (sub-) domains are color-coded: blue: PR; dark green: polymerase domain, the region 107-143 is shown in italics; bright green: connection subdomain; red: RNase H; Numbers on the left indicate amino acid positions. Amino acids labeled in black are either not assigned (aa 102 – 106).

Figure S2



**Figure S2: Determination of  $K_d$ -values by fluorescence anisotropy measurements.** 15 nM of a fluorescently labeled DNA/DNA substrate was titrated with different SFVmac PR-RT constructs at 25 °C. The curves represent the best fit based upon a two-component binding model.  $K_d$ -values with standard deviations are given in Table 1. (A) SFVmac PR-RT (●) and RT(107-759) (○), (B) SFVmac PR-RT(1-590) (▲) and RT(107-590) (△), (C) SFVmac PR-RT(1-454) (◆) and RT(107-454) (◇). Please note the different scales on the x-axes of the panels.

## **8 Einzelarbeit B**

Ralf Spannaus, Anna Schneider, Maximilian J. Hartl, Birgitta M. Wöhrl, Jochen Bodem (2013): Foamy Virus Gag p71-p68 cleavage is required for template switch of the reverse transcriptase. *Journal of Virology* **87**: 7774-7776.



# Foamy Virus Gag p71-p68 Cleavage Is Required for Template Switch of the Reverse Transcriptase

Ralf Spannaus,<sup>a</sup> Anna Schneider,<sup>b</sup> Maximilian J. Hartl,<sup>b</sup> Birgitta M. Wöhrl,<sup>b</sup> Jochen Bodem<sup>a</sup>

Universität Würzburg, Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Germany<sup>a</sup>; Universität Bayreuth, Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere, and Research Center for Biomacromolecules, Bayreuth, Germany<sup>b</sup>

**In contrast to orthoretroviruses, processing of foamy viral p71 Gag is limited to a single cleavage site. Nevertheless, Gag maturation is essential for infectivity, but deletion of p3 results in a modest drop in infectivity. Here, we show that Gag processing of p71 to p68 and p3 is essential for full-length cDNA synthesis, while inactivation of Gag cleavage results in cDNAs containing only the RU5 region; cDNAs encompassing the U3 region were almost undetectable.**

Retroviral Gag and Pol precursor proteins are processed by the viral protease (PR) (1). The Gag and Pol proteins of HIV-1 encode nine functional cleavage sites. Both proteins are processed during maturation (1). Only mature viruses were shown to be infectious. HIV-1 Gag maturation leads to conformational rearrangements of the Gag domains, which are visible by the formation of an electron-dense capsid structure in the matured virus. Furthermore, it was shown recently that Gag maturation is required for Env clustering on the virus surface (2). Foamy viruses (FV) on the other hand encode single cleavage sites in Gag and in Pol. The prototypic foamy viral p71 Gag protein is processed only at the carboxyl-terminal end to p68 and a p3 peptide. This cleavage was shown to be essential for viral infectivity (3, 4). Eminent structural changes induced by virus maturation were not observed by electron microscopy (EM) (5). In addition, it was shown that processing of FV Pol is not essential for reverse transcriptase (RT) activity (6) but was indispensable for genome integration (7).

To analyze the influence of prototype FV (PFV) Gag processing on infectivity and to recapitulate experiments that were done before, we inactivated either the Gag cleavage site or expressed only the processed p68 Gag form. First, we exchanged the wild-type Gag cleavage site sequence RAVN-TVTVQ with residues GALG-ALGA in the context of the codon-optimized expression plasmid (Fig. 1) (8, 9). This plasmid was named p71 $\Delta$ CS (Fig. 1). This modified cleavage site is not processed by the viral PR, as shown by Western blotting below. In a second *gag* mutant, all sequences downstream of p68 were removed and a stop codon was inserted directly downstream of p68, giving rise to the processed p68 form of Gag (Fig. 1). The p71 $\Delta$ CS and p68 expression constructs were coexpressed in HEK 293T cells ( $1.8 \times 10^6$ ) with codon-optimized expression constructs for *pol*-, *env*-, and a *gfp*-containing vector genome (10). As an additional control, cells were cotransfected with a previously described protease activity-deficient *pol* mutant, pPol D/A (5, 9) together with *gag*, *env*, and the genome-encoding vector pMD9. Three days after transfection, viral supernatants were collected, filtered, and cleared by size exclusion chromatography using HighTrap Capto Core 700 columns (GE Healthcare, Germany) and phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 6.46 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>). Viruses were collected by ultracentrifugation (201,149  $\times$  g, 4°C, 2 h), and Gag processing was visualized by Western blotting as described before (Fig. 1B) (9, 11, 12). All experiments in this study were repeated at least three times. This

analysis revealed that wild-type Gag was processed, leading to the characteristic p71-p68 double band, whereas the p71 $\Delta$ CS mutant remained unprocessed (Fig. 1B, lanes 1 and 2). The recombinant Gag p68 viruses expressed the expected single Gag p68 form (Fig. 1B, lane 3). Viral titers were determined on BHK-21 cells by serial dilutions (Fig. 1C). Viral Gag amounts were quantified, and viral titers were normalized on released Gag. The p71 $\Delta$ CS recombinant viruses were almost noninfectious (titer reduction more than 3 orders of magnitude), whereas deletion of the complete p3 domain reduced viral titers about 1 order of magnitude. The control transfection with the PR-inactivated Pol led to unprocessed Gag and noninfectious virus as expected. These results indicate that Gag processing is essential for infectivity, while complete deletion of the p3 domain has only limited effects on infectivity.

To further investigate effects of Gag processing on viral infectivity, we have analyzed the effect of single amino acid exchanges within the Gag cleavage site on Gag processing. We identified that the exchange of amino acid residue N621G led to complete Gag cleavage, whereas the exchange of V620G inhibited processing completely (Fig. 1B). HEK 293T cells were cotransfected with these *gag* constructs and with expression plasmids for *pol* and *env* and pMD9. Viruses were concentrated, and viral titers were determined as described above (Fig. 1C). Gag processing was analyzed by Western blotting (Fig. 1B). In recombinant viruses with Gag N621G, only the processed p68 form of Gag was detected, whereas exchange of V620G led to complete inhibition of cleavage. This mutation resulted in noninfectious virus, while N621G showed a titer reduction similar to the p68 form of Gag (Fig. 1C).

Since structural changes due to Gag maturation were not found in electron microscopy (5), we sought to analyze effects of Gag cleavage on the RT reaction. The RT reaction occurs late in the foamy viral replication cycle and is almost completed before entry. First we wanted to determine whether the free p3 influences RT activity. Therefore, *in vitro* RT activity assays using protease-

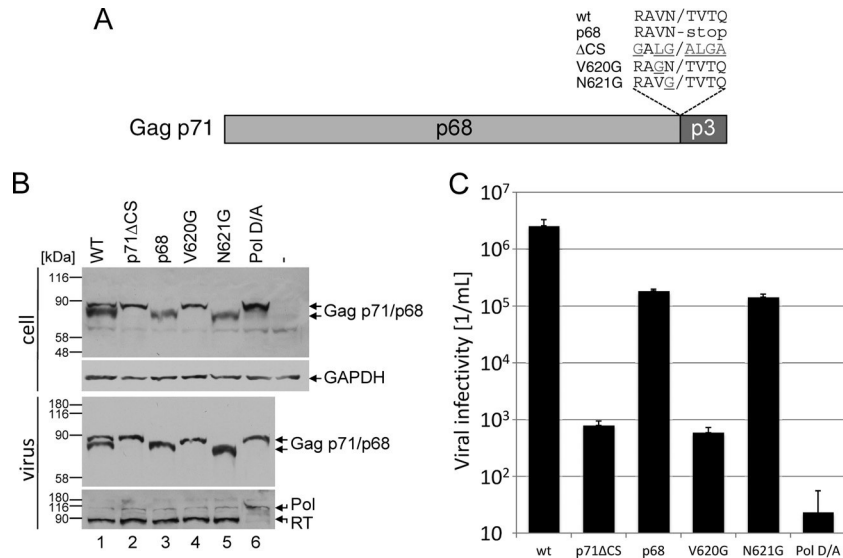
Received 27 March 2013 Accepted 17 April 2013

Published ahead of print 24 April 2013

Address correspondence to Jochen Bodem,  
Jochen.Bodem@vim.uni-wuerzburg.de.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

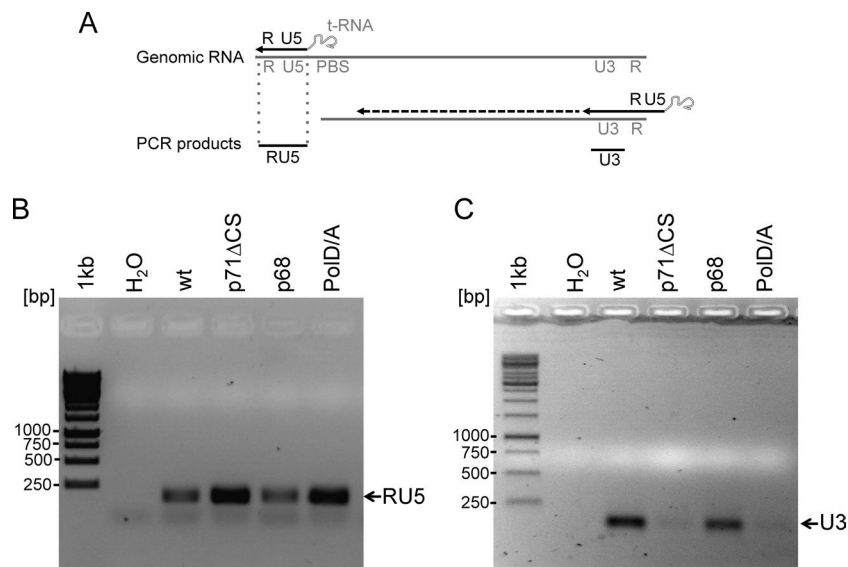
doi:10.1128/JVI.00833-13



**FIG 1** Foamy virus infectivity is correlated to Gag maturation. (A) Schema of the Gag p68-p3 cleavage sites used in this study. All plasmids were constructed by site-directed mutagenesis. wt, wild type. (B) Western blotting of purified recombinant with a monoclonal anti-Gag (upper and middle panel) or anti-Pol antibodies (lower panel). Positions of the size markers are indicated. WT, wild type. (C) Viral titers were determined on BHK-21 cells by serial dilutions as described before (8, 9). Error bars indicate the standard deviations of triplicate samples.

reverse transcriptase (PR-RT) either from prototype or simian FV were performed (13) in the absence of p3 (RT activity,  $23.7 \pm 1.1$  U/ $\mu$ g) or in the presence of equimolar concentrations (12 nM) of PR-RT and p3 (PFV p3 peptide, 5/6-fluorescein-AGDSRAVNTV TQSATSSTDESSAVTAASGGDQRD) (RT activity,  $26.6 \pm 1.7$  U/ $\mu$ g) or in a 6-fold excess of p3 peptide (RT activity,  $25.3 \pm 1.4$  U/ $\mu$ g). These results indicate that free p3 has no impact on RT activity, leading us to the hypothesis that Gag p71 might inhibit the RT reaction. To investigate this model, recombinant viruses were produced in HEK 293T cells using the Gag p71 $\Delta$ CS, p68, or

pPol D/A expression plasmids in the context of the foamy viral vector system as described above. Viruses were harvested by ultracentrifugation. Viral pellets were dissolved in PBS and treated with RNase-free DNase I to remove contaminating cellular and plasmid DNA. The samples were normalized on relative Gag amounts by quantitative Western blotting (data not shown), and equal amounts were directly used in PCRs using primers in the RU5 and U3 region (Fig. 2). The first PCR detects products of the earliest step of cDNA synthesis, i.e., the strong stop (–) DNA (Fig. 2A), whereas the latter amplifies products after the first template switch



**FIG 2** Foamy virus reverse transcriptase template switch is dependent on Gag processing. (A) Schema of the first steps of the reverse transcription and the position of the PCR products (DNA, black; RNA, gray). (B) Amplification of the RU5 region from viral cDNAs with primers located in R and U5. wt, wild type. (C) PCR with U3-specific primers using concentrated recombinant viruses as the template. The recombinant viruses were analyzed by Western blotting using a monoclonal Gag-specific antibody. The Gag signals of the different mutants were quantified using the AIDA software package (GE Healthcare) and normalized on Gag content, to guarantee equal Gag amounts in the PCRs. Identical amounts of concentrated viruses were used for RU5 and U3 PCR.

(Fig. 2A). The RU5 region-specific PCR led to similar amounts of PCR products, indicating that the initiation of the cDNA synthesis and elongation to the R region were equally efficient for all samples (Fig. 2B). Reverse transcription of the U3 region, after the first strong stop (Fig. 2A), was impaired by Gag p71, since cDNAs encompassing the U3 region of both p71 $\Delta$ CS and the protease activity-deficient pPol D/A viruses were found to be almost undetectable. The results indicate that Gag processing is essential for the first template switch.

In summary, we have shown that Gag processing is essential for FV infectivity, whereas the p3 region itself is not. Nonprocessed p71 seems to inhibit cDNA synthesis at the 1st template switch. We propose that p71 Gag binds to the 3' end of the viral RNA, thereby blocking the accessibility of the 3' end, which is required to perform the strand transfer reaction. Foamy virus particles contain a mixture of p68 and p71; thus, complete processing of all Gag molecules is not required for strand transfer. Therefore, blockage of strand transfer appears to be dependent on the concentration of uncleaved p71. We propose that by this mechanism cDNA synthesis is delayed until sufficient amounts of Gag and Pol are cleaved to ensure viral infectivity. This checkpoint is needed, because cDNA synthesis leads to degradation of the protease-activating RNA motif (PARM), which is essential for protease activity in FV (8) and therefore terminates processing of Gag and Pol.

## REFERENCES

- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. 1997. *Retroviruses* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Chojnacki J, Staudt T, Glass B, Bingen P, Engelhardt J, Anders M, Schneider J, Müller B, Hell SW, Kräusslich HG. 2012. Maturation-dependent HIV-1 surface protein redistribution revealed by fluorescence nanoscopy. *Science* 338:524–528.
- Enssle J, Fischer N, Moebes A, Mauer B, Smola U, Rethwilm A. 1997. Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J. Virol.* 71:7312–7317.
- Baldwin DN, Linial ML. 1999. Proteolytic activity, the carboxy terminus of Gag, and the primer binding site are not required for Pol incorporation into foamy virus particles. *J. Virol.* 73:6387–6393.
- Konvalinka J, Löchelt M, Zentgraf H, Flügel RM, Kräusslich HG. 1995. Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein. *J. Virol.* 69:7264–7268.
- Hütter S, Müllers E, Stanke N, Reh J, Lindemann D. 2013. Prototype foamy virus protease activity is essential for intraparticle reverse transcription initiation but not absolutely required for uncoating upon host cell entry. *J. Virol.* 87:3163–3176.
- Roy J, Linial ML. 2007. Role of the foamy virus Pol cleavage site in viral replication. *J. Virol.* 81:4956–4962.
- Hartl MJ, Bodem J, Jochheim F, Rethwilm A, Rösch P, Wöhrl BM. 2011. Regulation of foamy virus protease activity by viral RNA: a novel and unique mechanism among retroviruses. *J. Virol.* 85:4462–4469.
- Spannaus R, Hartl MJ, Wöhrl BM, Rethwilm A, Bodem J. 2012. The prototype foamy virus protease is active independently of the integrase domain. *Retrovirology* 9:41. doi:10.1186/1742-4690-9-41.
- Stirrnagel K, Lüftenegger D, Stange A, Swiersy A, Müllers E, Reh J, Stanke N, Grosse A, Chiantia S, Keller H, Schwille P, Hanenberg H, Zentgraf H, Lindemann D. 2010. Analysis of prototype foamy virus particle-host cell interaction with autofluorescent retroviral particles. *Retrovirology* 7:45. doi:10.1186/1742-4690-7-45.
- Imrich H, Heinkelein M, Herchenröder O, Rethwilm A. 2000. Primate foamy virus Pol proteins are imported into the nucleus. *J. Gen. Virol.* 81:2941–2947.
- Heinkelein M, Dressler M, Jarmy G, Rammling M, Imrich H, Thurow J, Lindemann D, Rethwilm A. 2002. Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J. Virol.* 76:3774–3783.
- Hartl MJ, Kretzschmar B, Frohn A, Nowrouzi A, Rethwilm A, Wöhrl BM. 2008. AZT resistance of simian foamy virus reverse transcriptase is based on the excision of AZTMP in the presence of ATP. *Nucleic Acids Res.* 36:1009–1016.





## 9 Einzelarbeit C

Anna Schneider, Kristian Schweimer, Paul Rösch, Birgitta M. Wöhrle (2015): AZT resistance alters enzymatic properties and creates an ATP-binding site in SFVmac reverse transcriptase. *Retrovirology* (im Druck); *Manuskript*





RESEARCH

Open Access

# AZT resistance alters enzymatic properties and creates an ATP-binding site in SFVmac reverse transcriptase

Anna Schneider, Kristian Schweimer, Paul Rösch and Birgitta M Wöhrl\*

## Abstract

**Background:** The replication of simian foamy virus from macaques can be inhibited by the nucleoside reverse transcriptase inhibitor azidothymidine (AZT, zidovudine). Four substitutions in the protease-reverse transcriptase (PR-RT) protein (K211I, I224T, S345T, E350K) are necessary to obtain highly AZT resistant and fully replication competent virus. AZT resistance is based on the excision of the incorporated AZTMP in the presence of ATP. I224T is a polymorphism which is not essential for AZT resistance per se, but is important for regaining efficient replication of the resistant virus.

**Results:** We constructed PR-RT enzymes harboring one to four amino acid substitutions to analyze them biochemically and to determine their ability to remove the incorporated AZTMP. S345T is the only single substitution variant exhibiting significant AZTMP excision activity. Although K211I alone showed no AZTMP excision activity, excision efficiency doubled when K211I was present in combination with S345T and E350K. K211I also decreased nucleotide binding affinity and increased fidelity. NMR titration experiments revealed that a truncated version of the highly AZT resistant *mt4* variant, comprising only the fingers-palm subdomains was able to bind ATP with a  $K_D$ -value of ca. 7.6 mM, whereas no ATP binding could be detected in the corresponding wild type protein. We could show by NMR spectroscopy that S345T is responsible for ATP binding, probably by making a tryptophan residue accessible.

**Conclusion:** Although AZT resistance in SFVmac is based on excision of the incorporated AZTMP like in HIV-1, the functions of the resistance substitutions in SFVmac PR-RT appear to be different. No mutation resulting in an aromatic residue like F/Y215 in HIV, which is responsible for  $\pi$ - $\pi$ -stacking interactions with ATP, is present in SFVmac. Instead, S345T is responsible for creating an ATP binding site, probably by making an already existing tryptophan more accessible, which in turn can interact with ATP. This is in contrast to HIV-1 RT, in which an ATP binding site is present in the WT RT but differs from that of the AZT resistant enzyme.

**Keywords:** AZT resistance, ATP binding, Reverse transcriptase, NMR, Foamy virus, HIV

## Background

Simian foamy virus from macaques (SFVmac) belongs to the subfamily of *Spumaretrovirinae*, which, together with the *Orthoretrovirinae* form the family of *Retroviridae* [1]. A considerable difference between the two subfamilies concerns the nature of the cleavage products of the Pol protein, which consists of the protease (PR), reverse transcriptase (RT) and integrase (IN) domains. While in orthoretroviruses the viral enzymes are cleaved

from a Gag-Pol precursor protein into PR, RT and IN, foamy viruses (FVs) possess a separate Pol precursor and do not cleave off the PR domain from the RT. Thus, the mature FV enzymes are PR-RT and IN [2,3]. The mature PR-RT is a monomeric protein with the PR (101 amino acid residues) located at its N-terminus [3]. The PR is separated from the putative N-terminus of the RT domain via a stretch of 41 amino acid residues (region 102–143) whose presence appears to be important for RT integrity and proper orientation of the PR domain, which needs to dimerize in order to be active [4–7].

So far, only the human immunodeficiency (HIV) nucleotide RT inhibitor (NtRTI) tenofovir and the

\* Correspondence: birgitta.woehrl@uni-bayreuth.de  
Universität Bayreuth, Lehrstuhl Biopolymere, Universitätsstr. 30, D-95447  
Bayreuth, Germany

nucleoside RT inhibitor (NRTI) azidothymidine (AZT, zidovudine) have been shown to inhibit SFVmac replication [8-11]. Both substances are used for treating patients suffering from HIV infections.

Interestingly, both SFVmac and HIV-1 RT follow a similar AZT resistance mechanism: the incorporated chain terminating AZT-monophosphate (AZTMP) is excised in the presence of ATP [12-14]. It has been shown that the pyrophosphate donor in AZT resistant HIV-1 and SFVmac is ATP [12-14]. In HIV-1, the excision reaction products are a dinucleoside tetraphosphate (AZT-P<sub>4</sub>-A) derived from ATP and AZTMP at the primer terminus and the resulting unblocked 3'OH primer [12]. Formation of the phosphodiester bond between ATP and AZTMP also requires specific ATP binding near the polymerase active site which orients the  $\beta,\gamma$ -phosphate moiety of ATP proximal to the phosphate group of AZTMP. Removal of AZTMP finally leads to primer rescue and elongation with natural dNTPs [15-17].

In SFVmac PR-RT four amino acid exchanges (K211I, I224T, S345T, E350K) are necessary to confer high resistance against AZT. Amino acid sequence alignments of the polymerase domains of SFVmac and HIV-1 revealed that the SFVmac AZT resistance mutations do not correspond to the ones obtained with highly AZT-resistant HIV-1 RT (M41L, D67N, K70R, T215Y/F and K219Q/E) [12-14,17-21]. In HIV-1 the amino acid exchange T215Y/F is crucial for binding of ATP in the AZT resistant mutant RT. X-ray crystallography data revealed that both the WT and the AZT resistant RT are capable of ATP binding, however at different sites (site I and site II). The aromatic amino acid exchange T215F/Y in the resistant protein allows binding of ATP in site II and the formation of  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions with the adenine ring of ATP, necessary for AZTMP excision [15,17].

Comparison of the AZT resistance mutations selected in HIV-1 and SFVmac shows that in SFVmac no exchange to an aromatic amino acid homologous to T215Y/F occurs. This raises the question as to what the functions of the individual mutations in the AZT resistant SFVmac RT are. We have shown previously that the amino acid exchange I224T is important for viral fitness but not for AZT resistance per se, i.e. it is not required for the AZTMP excision reaction [11,14].

Comparative studies on AZT resistance in ortho- and spumaretroviruses can shed light on the general requirements for AZTMP excision. HIV-1 and SFVmac achieve AZT resistance by AZTMP excision using different, non-homologous resistance pathways. In order to disclose the functions of the individual mutations for AZT resistance and the molecular mechanism in SFVmac PR-RT, we characterized the biochemical properties of various PR-RT variants harboring single, double, triple, and quadruple amino acid substitutions and analyzed the

ability of the variants to excise AZTMP. Moreover, we examined ATP binding via NMR spectroscopy.

Here, we determined for the first time the molecular mechanism for AZT resistance in a monomeric RT as well as the dissociation constant for ATP in an AZT resistant retroviral RT.

## Results and discussion

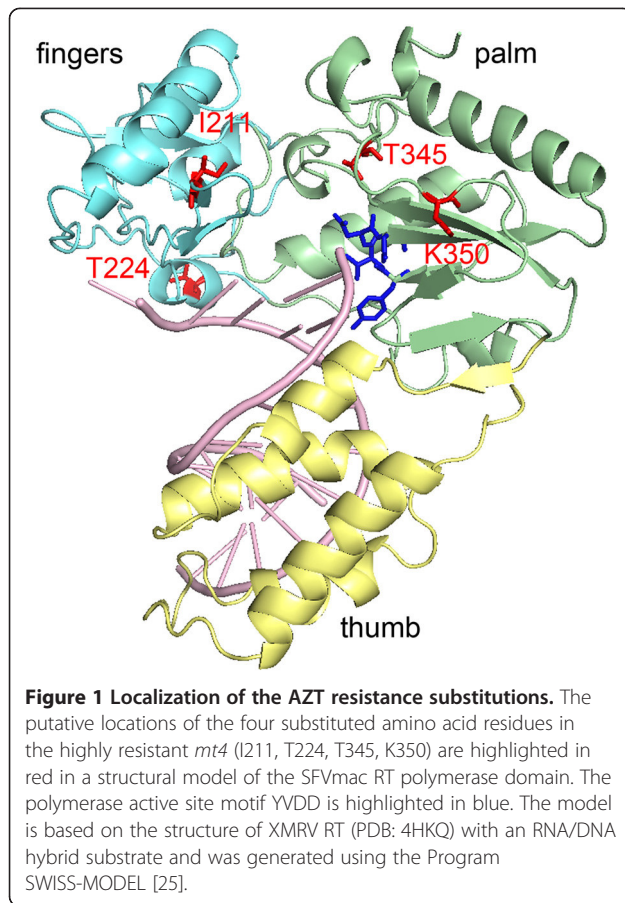
### Protein variants

We have shown previously that the purified SFVmac PR-RTs *mt3* (K211I, S345K, E350K) and *mt4* (K211I, I224T, S345K, E350K) are able to excise AZTMP with similar efficiency from an AZTMP-terminated primer in the presence of ATP [14]. The I224T exchange in *mt4* is probably a polymorphism and does not contribute substantially to AZT-resistance but to viral fitness [11,14]. To reveal the individual contribution of the amino acid exchanges in SFVmac PR-RT for AZT resistance we analyzed various PR-RT enzymes with one to four amino acid substitutions in the polymerase domain. Additionally, all PR-RT enzymes used, carry a mutation in the PR domain leading to the active site residue exchange D24A. This renders the enzymes inactive as a protease. Thus, unintentional PR cleavage can be excluded.

RTs and several other DNA polymerases share a common three-dimensional structure, which is usually compared to the shape of a right hand with the so-called fingers, thumb, and palm subdomains [22-24]. The active site residues are located in the palm, while the thumb and fingers regions wrap around the nucleic acid substrate. Thus, the putative localization of the four exchanged amino acids in AZT resistant SFVmac PR-RT with regard to the polymerase active site could be determined by modeling the structure of the SFVmac polymerase domain with the Program SWISS-MODEL [25] using xenotropic murine leukemia-like related virus (XMRV) RT (pdb: 4HKQ) with a sequence homology of approximately 29 % as a template [22] (Figure 1). Similarly to SFVmac PR-RT this enzyme is also monomeric. The model shows that the polymorphism I224T is located at some distance to the active site residues YVDD, while S345T and E350K are positioned in the palm subdomain next to the active site and thus could be involved in ATP-binding. K211I is part of a loop in the fingers subdomain, homologous to the beta  $\beta$ 3- $\beta$ 4 loop in HIV-1 RT. In HIV-1 RT this loop contains the basic amino acids K65 and R72 that interact with the phosphates of an incoming dNTP. These residues have been shown to be important for polymerization activity, drug resistance, and fidelity [26,27].

### Polymerization properties

To show that the purified recombinant proteins harboring one to four amino acid exchanges (Figure 2A) were

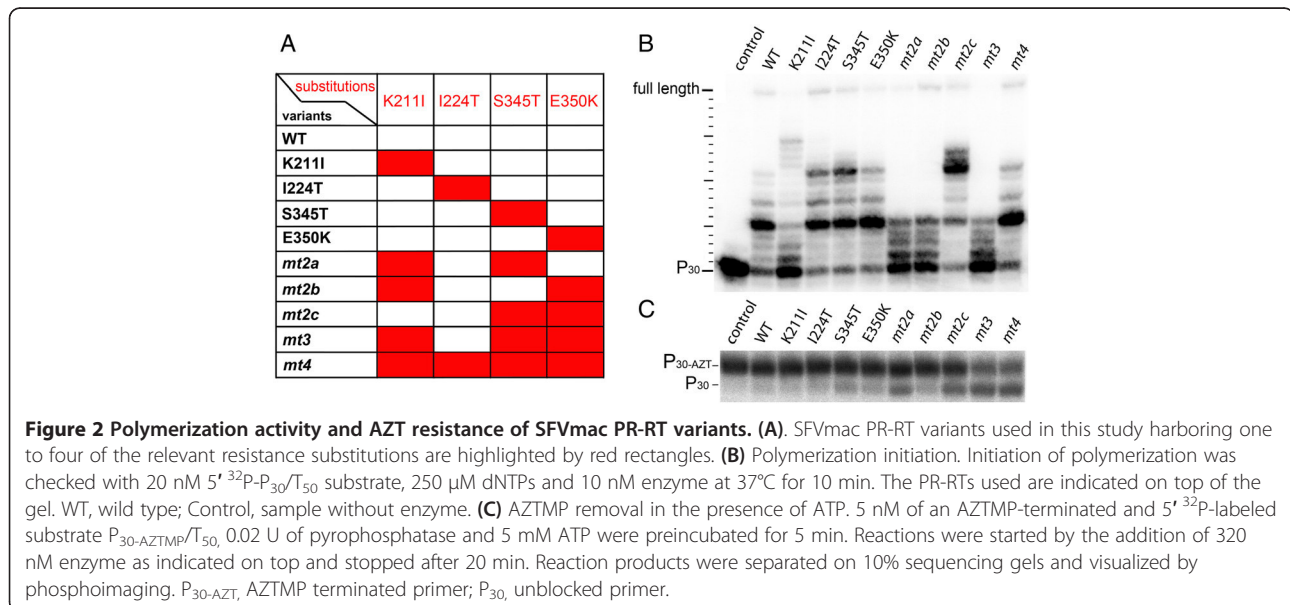


still active as polymerases we determined their specific activities on a poly(rA)/oligo(dT) substrate (Table 1). Obviously, the K211I exchange results in severely reduced polymerization activity since the single as well as the double variants harboring K211I (*mt2a*, *mt2b*) are impaired. In contrast, *mt2c* lacking K211I exhibits high polymerization activity. Remarkably, the specific polymerization activity of E350K is significantly higher than that of the WT.

Since the specific activities of the variants containing K211I were considerably lower than the WT activities, we performed primer extension assays with a 30/50mer DNA/DNA ( $P_{30}/T_{50}$ ) substrate which was 5'  $^{32}P$  end-labeled at the primer. Conditions were chosen that allowed the investigation of the first nucleotide addition steps (Figure 2B) to determine whether the enzymes are impaired in initiating polymerization. Although all proteins were able to extend the primer by a few nucleotides, K211I appeared to be the least active enzyme among the single exchange variants. Accordingly, *mt2a* and *mt2b*, also harboring the K211I substitution, were less efficient in initiating polymerization than *mt2c*. The latter shows an even higher activity than the WT. These data are also reflected in the specific polymerization activities measured with the homopolymeric substrate poly(rA)/oligo(dT) (Table 1). Interestingly, due to the presence of K211I, the activity of *mt3* is reduced as compared to the WT. However, the polymerization behavior of *mt4* is again comparable to the WT owing to the presence of the polymorphism I224T.

### AZT resistance

AZT resistance in SFVmac is based on the removal of the incorporated AZTMP in the presence of ATP [14]. Therefore, to elucidate the function of the individual



**Table 1 Specific polymerization activities and AZT resistance of SFVmac PR-RTs and corresponding viruses**

Enzyme	<sup>1</sup> SPAC	p-value	<sup>2</sup> AZTMP excision (%)	<sup>3</sup> Viral titer in %	
				w/o AZT	5 $\mu$ M AZT
WT	28.6 ( $\pm$ 3.1)	-	3.0 ( $\pm$ 1.1)	100	<0.1
K211I	7.0 ( $\pm$ 4.8)	0.005	2.4 ( $\pm$ 1.4)	1.2 ( $\pm$ 1.2)	<0.1
I224T	22.5 ( $\pm$ 10.3)	0.410	3.5 ( $\pm$ 1.4)	146.5 ( $\pm$ 21.4)	0.1
S345T	28.8 ( $\pm$ 8.3)	0.977	10.4 ( $\pm$ 1.2)	40.0 ( $\pm$ 16.8)	1.1 ( $\pm$ 1.0)
E350K	44.7 ( $\pm$ 2.1)	0.003	2.8 ( $\pm$ 0.7)	31.7 ( $\pm$ 8.8)	<0.1
<i>mt2a</i>	13.3 ( $\pm$ 0.9)	0.009	14.5 ( $\pm$ 0.7)	<0.1	<0.1
<i>mt2b</i>	8.7 ( $\pm$ 2.9)	0.001	7.9 ( $\pm$ 0.6)	23.0 ( $\pm$ 7.9)	<0.1
<i>mt2c</i>	32.6 ( $\pm$ 13.8)	0.667	18.7 ( $\pm$ 1.2)	20.6 ( $\pm$ 5.5)	3.0 ( $\pm$ 2.1)
<i>mt3</i>	15.5 ( $\pm$ 2.6)	0.005	35.4 ( $\pm$ 0.6)	8.6 ( $\pm$ 2.7)	2.8 ( $\pm$ 1.3)
<i>mt4</i>	21.7 ( $\pm$ 3.9)	0.079	37.9 ( $\pm$ 1.3)	113.0 ( $\pm$ 19.2)	68.8 ( $\pm$ 18.8)

<sup>1</sup>SPAC, specific activity in U/10 min\* $\mu$ g<sub>protein</sub>. One Unit (U) catalyzes the incorporation of 1 nmol TTP in a poly(rA)/oligo(dT)<sub>15</sub> in 10 min at 37°C by 1  $\mu$ g PR-RT. The values are the means and standard deviations of at least three independent experiments. The p-values were calculated using the unpaired *t*-test in which we compared each variant with the WT. p-values  $\leq$ 0.05 are considered significant. <sup>2</sup>Quantification of AZTMP removal depicted in Figure 2C was achieved by phosphoimaging. The amount of unblocked primer after AZTMP excision ( $P_{30}$ ) is equivalent to the quantity of excised AZTMP and is given as a percentage of the total amount of primer in the reaction. <sup>3</sup>Data taken from [11]. The viral titers in the cell free supernatants of the WT in the absence of AZT were set to 100% ( $\approx$  viral titer of  $7 \times 10^4$ ). Titers of mutant viruses are expressed relative to the WT. Standard errors are given in parenthesis.

substitutions for AZT resistance, we tested the AZTMP excision efficiency using a 5' <sup>32</sup>P-endlabeled and AZTMP-terminated primer/template substrate ( $P_{30}$ -AZT/ $T_{50}$ ) and 5 mM ATP (Figure 2C, Table 1). Only one of the singly substituted variants, i.e. S345T, showed significant (>5%) AZTMP excision activity. This indicates that S345T is the key amino acid exchange for AZTMP removal. As shown above, the inability of the other single variants to remove incorporated AZTMP is not due to a lack of polymerization activity (Table 1, Figure 2B). We have shown previously that the single amino acid exchange S345T leads to moderate drug resistance of the virus in the presence of 0.5 – 5  $\mu$ M AZT. However, in the absence of AZT it resulted in reduced viral titer (40%) as compared to the WT virus [11] (Table 1).

Among the enzyme variants carrying two substitutions, a combination of the key exchange S345T with K211I (*mt2a*) improved the excision efficiency as compared to S345T alone from ca. 10 to 15%, and the combination of S345T with E350K (*mt2c*) almost doubled the excision efficiency (ca. 19%) (Table 1). In contrast, *mt2b*, lacking the S345T substitution, exhibited no significant AZTMP removal activity.

Remarkably, the virus harboring the corresponding substitutions of *mt2a* was not able to replicate, neither in the presence nor in the absence of AZT, although the purified PR-RT variant still showed polymerization activity, albeit reduced (Figure 2B). Virus *mt2c* exhibited moderate AZT resistance, but in the absence of AZT the viral fitness was reduced to ca. 20% as compared to the WT virus [11] (Table 1). These data imply that E350K might be the second AZT resistance mutation, since the combination of the putative first exchange S345T with

K211I leads to replication deficient virus (Table 1). The combination of K211I and E350K (*mt2b*) showed little AZTMP excision *in vitro*. This was reflected in cell culture assays with the corresponding virus, which was unable to replicate in the presence of 5  $\mu$ M AZT [11] (Table 1). Obviously, the K211I exchange on its own and in *mt2a* yields replication deficient virus (Figure 2B, Table 1) [11]. However, in *mt3* the presence of K211I supported AZTMP removal. Compared to *mt2c*, the excision efficiency of *mt3* was about 2-fold higher (Table 1). Moreover, the high excision activity was retained with *mt4*, confirming that I224T improves viral fitness in the fully resistant virus but is not involved in AZT resistance per se. This was also illustrated by the fact that the dramatic decrease of viral titer with the *mt3* virus (8.6% of the WT virus) in the absence of AZT was fully compensated by I224T in the *mt4* virus, bringing the titer back to WT levels (ca. 113%) (Table 1) [11].

Taken together, these data show that the single substitution S345T results in moderate AZTMP excision activity, which can be further improved in combination with K211I or E350K. The major gain in AZTMP excision efficiency is due to the additional exchange K211I. However, this substitution leads to an impaired polymerization reaction, which can be recovered in *mt4* by I224T.

#### RNase H activities

In HIV-1 RT certain substitutions in the connection subdomain or RNase H domain leading to a reduced RNase H activity can enhance AZT resistance on a DNA/RNA primer/template. Slowing down the RNase H activity allows the enzyme more time for AZTMP excision to take place [28-30]. To investigate whether the substitutions

in SFVmac PR-RT, although not in the connection subdomain or RNase H domain, influence the RNase H activity, we performed qualitative RNase H assays with a 5'  $^{32}\text{P}$ -end-labeled RNA<sub>25</sub>/DNA<sub>22</sub> substrate (Figure 3). However, no significant reduction of the RNase H activities could be detected. Rather, quantification of the cleavage products indicated that E350K exhibits a significantly higher RNase H activity than all the other enzymes. Apart from this effect no significant differences, e.g. in the cleavage pattern, could be detected, implying no influence of the RNase H activity on AZT resistance.

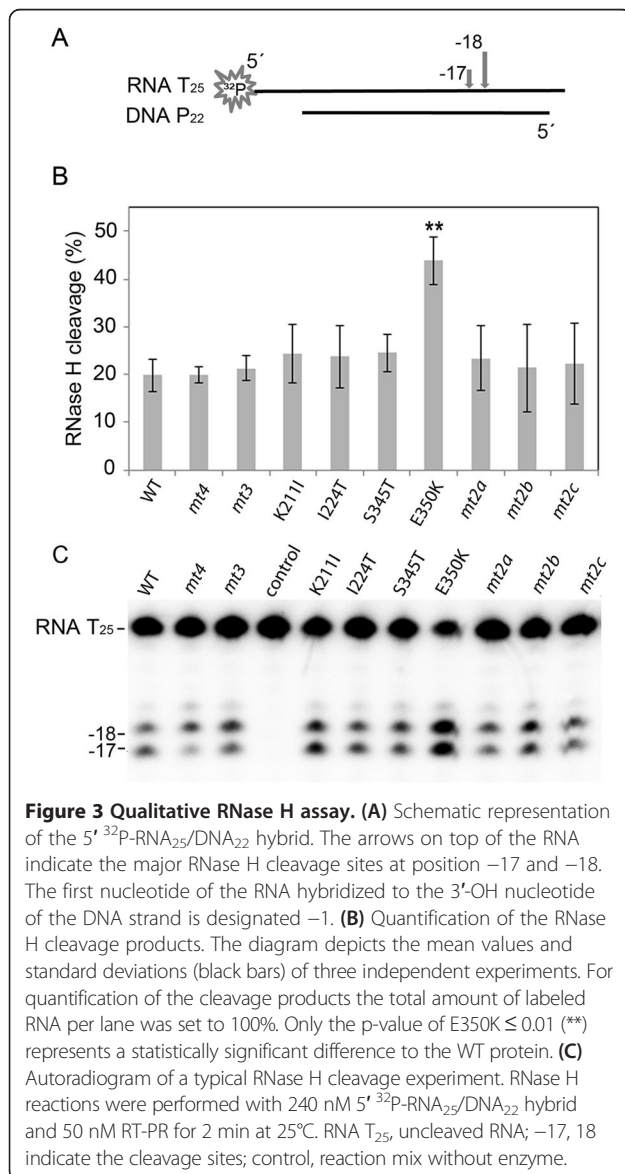
#### Kinetic parameters for polymerization and DNA binding

To further assess the effect of the K211I substitution on AZT resistance, we determined the kinetic parameters of the enzymes (Table 2). The reduced polymerization

**Table 2 Kinetic parameters of SFVmac PR-RTs for polymerization and DNA binding**

Enzyme	$^1K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$^1V_{\text{max}}$ (mM/min)	$V_{\text{max}}/K_M$ (1/min)	$^2K_D$ P/T (nM)
WT	57 ( $\pm 7$ )	2.1 ( $\pm 0.08$ )	36.8 ( $\pm 4.7$ )	9.6 ( $\pm 0.7$ )
K211I	160 ( $\pm 28$ )	0.3 ( $\pm 0.02$ )	1.9 ( $\pm 0.4$ )	19.6 ( $\pm 2.3$ )
I224T	94 ( $\pm 9$ )	2.2 ( $\pm 0.08$ )	23.4 ( $\pm 2.4$ )	8.9 ( $\pm 1.4$ )
S345T	34 ( $\pm 6$ )	1.1 ( $\pm 0.05$ )	32.4 ( $\pm 5.9$ )	8.7 ( $\pm 0.9$ )
E350K	32 ( $\pm 8$ )	1.8 ( $\pm 0.10$ )	56.3 ( $\pm 14.4$ )	9.7 ( $\pm 1.7$ )
<i>mt2a</i>	252 ( $\pm 39$ )	0.5 ( $\pm 0.04$ )	2.0 ( $\pm 0.3$ )	7.8 ( $\pm 1.2$ )
<i>mt2b</i>	159 ( $\pm 41$ )	0.6 ( $\pm 0.02$ )	3.8 ( $\pm 1.0$ )	15.8 ( $\pm 2.5$ )
<i>mt2c</i>	9 ( $\pm 3$ )	2.5 ( $\pm 0.10$ )	277.8 ( $\pm 92.6$ )	17.2 ( $\pm 2.1$ )
<i>mt3</i>	67 ( $\pm 14$ )	2.0 ( $\pm 0.10$ )	29.9 ( $\pm 6.2$ )	15.8 ( $\pm 2.1$ )
<i>mt4</i>	110 ( $\pm 11$ )	1.3 ( $\pm 0.05$ )	11.8 ( $\pm 1.3$ )	9.5 ( $\pm 1.6$ )

$^1K_M$ - and  $v_{\text{max}}$ -values were obtained by using the Michaelis-Menten equation to fit a curve to the data.  $^2K_D$ -values were obtained as described previously [14] by using an equation for a two state model to fit a curve to the titration data. Standard errors are given in parenthesis.



**Figure 3 Qualitative RNase H assay.** (A) Schematic representation of the 5'  $^{32}\text{P}$ -RNA<sub>25</sub>/DNA<sub>22</sub> hybrid. The arrows on top of the RNA indicate the major RNase H cleavage sites at position -17 and -18. The first nucleotide of the RNA hybridized to the 3'-OH nucleotide of the DNA strand is designated -1. (B) Quantification of the RNase H cleavage products. The diagram depicts the mean values and standard deviations (black bars) of three independent experiments. For quantification of the cleavage products the total amount of labeled RNA per lane was set to 100%. Only the p-value of E350K  $\leq 0.01$  (\*\*) represents a statistically significant difference to the WT protein. (C) Autoradiogram of a typical RNase H cleavage experiment. RNase H reactions were performed with 240 nM 5'  $^{32}\text{P}$ -RNA<sub>25</sub>/DNA<sub>22</sub> hybrid and 50 nM RT-PR for 2 min at 25°C. RNA T<sub>25</sub>, uncleaved RNA; -17, 18 indicate the cleavage sites; control, reaction mix without enzyme.

activity of variant K211I might be due to changes in affinities for the nucleic acid substrate and/or the dNTP. Determination of  $K_M$ - and  $v_{\text{max}}$ -values as well as the  $v_{\text{max}}/K_M$  ratio for nucleotide incorporation points in this direction.  $K_M$ -values of K211I and variants harboring K211I (*mt2b* and *mt2a*) were about 3-fold (*mt2b*) or 5-fold (*mt2a*) higher than that of the WT enzyme. In contrast, WT  $v_{\text{max}}$  values are about 4- to 7-fold higher. E350K and *mt2c* reach higher  $v_{\text{max}}/K_M$ -values than the WT, indicating higher catalytic activities (Table 2). However, this effect was obliterated by the introduction of K211I. The activity of the resulting *mt3* was again similar to the WT.

Fluorescence anisotropy measurements with a fluorescent labeled DNA/DNA P/T resulted in similar  $K_D$ -values for all enzymes (Table 2). These findings confirm that K211I leads to an impairment of polymerization activity due to a decrease in nucleotide binding affinity, but not by altering the P/T binding affinity. Furthermore, substitution E350K and I224T appear to compensate the polymerization deficiency of K211I in the *mt3* variant as well as in the highly resistant *mt4* protein.

#### Fidelity

The basic amino acid residues K65 und R72 in the  $\beta 3$ - $\beta 4$  loop region of the HIV-1 RT fingers subdomain not only have an impact on nucleotide binding affinity, but also on fidelity [26,27,31]. The fidelity of a polymerase describes the accuracy of nucleotide incorporation. Therefore, we investigated whether K211I, which is also positioned in the fingers subdomain, alters the SFVmac PR-RT's fidelity. We used a DNA/DNA P<sub>30</sub>/T<sub>50</sub>dA substrate labeled at the 5' end of the primer to determine how efficient the primer can be elongated with a

complementary (dTTP) or a mismatched dNTP (dATP) (Figure 4A). To overcome the reduced nucleotide binding affinity caused by K211I, a 5-fold higher nucleotide concentration than in the polymerization assay was used for all enzymes.

In the presence of the complementary dTTP all enzymes extended the primer by one nucleotide with similar efficiency (Figure 4B, Additional file 1: Table S1), whereas additional nucleotide incorporations were due to mismatch events. In contrast, when non-templated dATP was used, primer extensions varied considerably (Figure 4C). Quantification of the extended primer after misincorporation disclosed that variant K211I, as well as *mt2a* and *mt2b*, also harboring the K211I exchange, exhibited a significantly higher fidelity than the other enzymes, i.e. reduced incorporation efficiency for the mismatched dATP. *mt2c*, lacking the K211I substitution, showed a behavior similar to the WT enzyme (Figure 4C, Additional file 1: Table S1). In *mt3*, S345T and E350K appear to compensate the effect of K211I, since *mt3*, although containing the K211I exchange exhibited WT fidelity. Due to a decreased binding affinity for all dNTPs in enzymes harboring K211I, dissociation of the incorrect nucleotide and thereby correct base pairing is facilitated. This is similar to the results shown with the substitutions K65R and M184V/I in HIV-1 RT revealing an inverse correlation between fidelity and processivity or activity of the RT [26,27,32-35].

In *mt3* the reduced viral fitness of K211I is improved by S345T and E350K (Table 1), whereas the impaired fidelity caused by S345T and E350K is counteracted by K211I (Figure 4C). However, in order to restore viral fitness completely, the additional exchange I224T, resulting in *mt4*, is required. Thus, some of the mutations in AZT resistant SFVmac RT *mt4* are not absolutely required for AZTMP removal but compensate the negative effects of the substitutions crucial for resistance.

#### ATP binding analysis

Interactions of proteins with ligands, e.g. ATP, can be investigated by NMR spectroscopy. An NMR spectrum of a  $^{15}\text{N}$  labeled protein, which correlates resonance frequencies of amide protons and directly bonded  $^{15}\text{N}$  labeled nitrogen atoms (2D [ $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ] HSQC, *heteronuclear single quantum correlation*) allows the individual detection of peptide amide signals in the protein. Each signal represents a single amino acid of the peptide chain. Chemical shifts are very sensitive to the local structure of the protein. Changes in the chemical environment of amino acids, e.g. due to ATP binding, lead to chemical shift changes in the spectrum which indicate interactions between the protein and ATP.

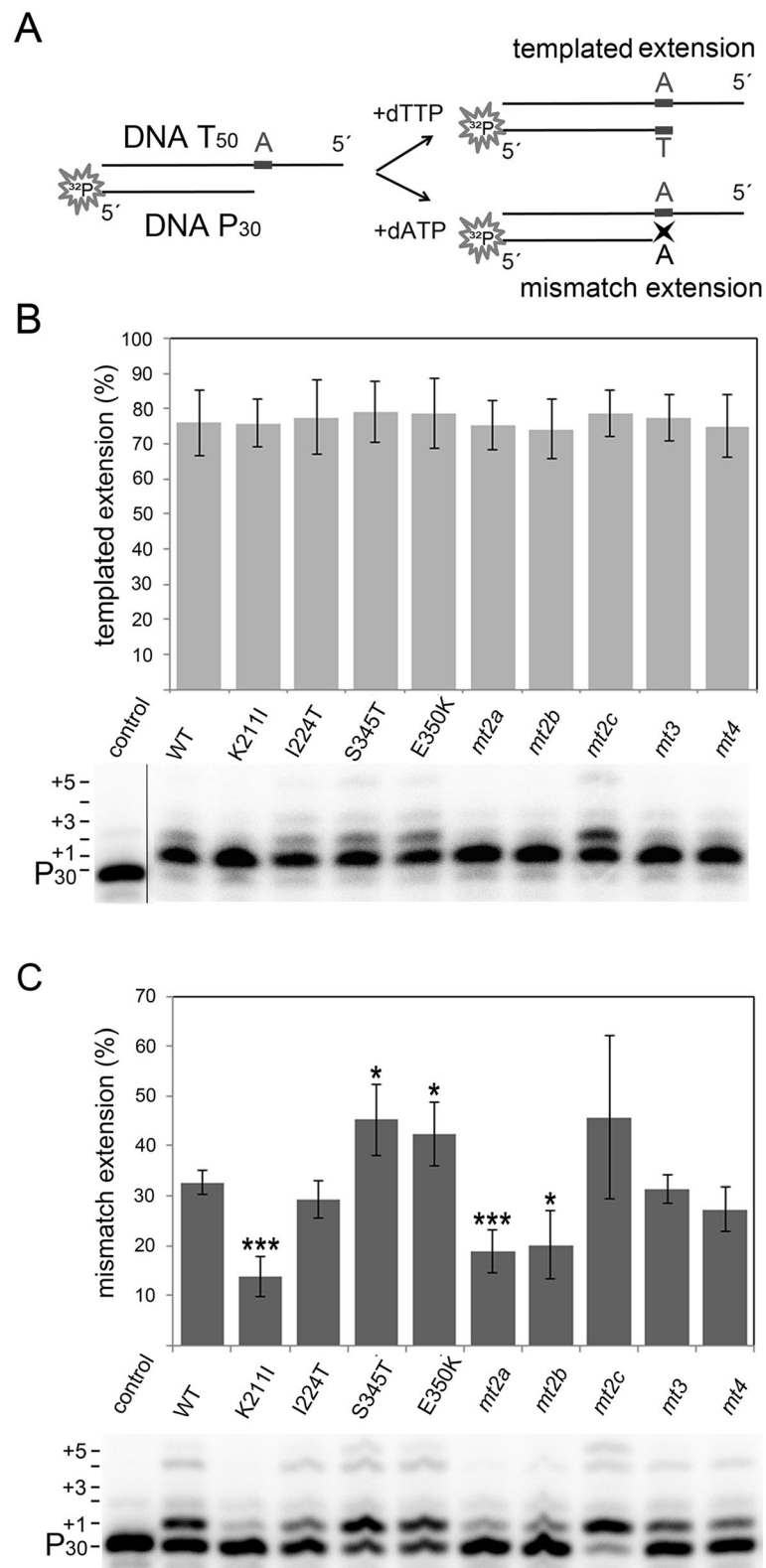
Analysis of large proteins by NMR is limited due to extensive signal overlaps and a severe reduction in signal

intensity. To obtain an RT small enough and suitable for NMR analysis, we constructed a truncated SFVmac polymerase domain lacking the thumb but comprising the fingers and palm subdomains that contain all four amino acid substitutions for AZT resistance. In previous work, we have already determined the starting point of the RT domain at residue 107 of the PR-RT enzyme. Deletion of the PR at that residue provides a soluble and catalytically active RT [4]. Based on sequence alignments with a catalytic fragment of Moloney murine leukemia virus (MoMLV) RT [36], the corresponding region of SFVmac RT harboring amino acid residues 107–368 (RTshort) was constructed. Determination of its specific activity for polymerization on poly(rA)/oligo(dT) indicated a very low polymerization activity (0.83 U), however, the protein was still able to bind double stranded DNA, albeit with a ca. 100 fold higher  $K_D$ -value ( $3.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ) than the WT enzyme [3]. The  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC of RTshort-WT recorded in the absence and presence of 21 mM ATP (58 fold excess) revealed no significant chemical shift changes upon ATP addition (Figure 5A), indicating lack of ATP binding, although the concentration is far beyond published physiological values of < 10 mM [37-39].

However, with AZT resistant RTshort-*mt4* several significant chemical shift changes upon ATP addition (48-fold excess) could be observed, demonstrating ATP binding. Since S345T is the only single amino acid exchange exhibiting AZTMP excision activity (Figure 2C), we reversed the S345T exchange in RTshort-*mt4* back to WT (=RTshort-*mt4*-T345S) and recorded  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra in the absence and presence of ATP (Figure 5C). Even at a 59-fold excess of ATP no chemical shift changes were detectable in the spectrum of RTshort-*mt4*-T345S. This result indicates a key role of the S345T substitution in AZT resistance via creating an ATP binding pocket, which is necessary for the excision mechanism.

Assignment of protein backbone resonances by TROSY-based triple resonance NMR analyses using a  $^2\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  labeled RTshort-*mt4* sample failed due to insufficient sample stability (precipitation) over the course of the experiments. Using the initially recorded HNCA experiment together with known chemical shift regions, the  $^1\text{H}$  chemical shift signals between 10.0 and 10.5 ppm in the  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC spectrum could be identified as tryptophan residues (indol-NH resonances). Typically, the indol-NH-resonances are located in the chemical shift range between 9.5 and 10.5 ppm [40,41]. Comparison of the spectra (Figure 5, boxes a) proves that a Trp residue is involved in ATP binding in RTshort-*mt4*, since a chemical shift change is detectable in the relevant ppm-range (Figure 5B, box a). Obviously, this Trp residue is obscured in RTshort-WT as well as in RTshort-*mt4*-T345S. The chemical shift change of a Trp residue





**Figure 4** (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Figure 4 Fidelity of PR-RTs.** 20 nM of a 5' <sup>32</sup>P endlabeled P<sub>30</sub>/T<sub>50</sub>dA DNA/DNA substrate was incubated with 1.25 mM of the correct (dTTP) or incorrect (dATP) nucleotide for polymerization. Reaction products were separated on a 10% sequencing gel. **(A)** Schematic representation of primer extension with the correct nucleotide and primer extension after one nucleotide mismatch. **(B)** Primer extensions in the presence of the next templated nucleotide (dTTP). Control, assay without enzyme. The diagram (top) depicts the mean values and standard deviations (black bars) of three independent experiments. The autoradiogram (bottom) shows the result of a typical extension experiment. The length of the extensions (P<sub>31</sub> to P<sub>35</sub>) is indicated on the left. Since the bands above P<sub>31</sub> all comprise the first correct dTTP incorporation they were also included in quantification of the primer extension. For quantification of the extended products the total amount of labeled DNA per lane was set to 100%. **(C)** Mismatch primer extensions in the presence of a non-templated nucleotide (dATP). Evaluation of the results as in **(B)**. P-values ≤ 0.05 represent statistically significant differences to the WT protein (\* p-value ≤ 0.05; \*\* p-value ≤ 0.01; \*\*\* p-value ≤ 0.001).

suggests a direct contact of that residue with ATP via  $\pi$ - $\pi$  interactions, very similar to the interactions between ATP and F/Y215 in HIV-1 RT [15]. In the highly AZT resistant SFVmac PR-RT the substitution S345T might alter the surface exposed residues in its vicinity and thus makes a Trp residue more accessible for hydrophobic interactions with ATP. In contrast to HIV-1 RT, AZT resistance substitutions in SFVmac PR-RT do not result in an aromatic amino acid, but instead make an already existent Trp accessible to fulfill a similar task as the T215Y/F exchange in HIV-1 RT.

#### Dissociation constant for ATP binding

To assess the  $K_D$ -value for ATP binding in RTshort-*mt4* we needed to improve the quality of the spectra. Therefore, RTshort-*mt4* was deuterated in addition to <sup>15</sup>N labeling to allow the recording of TROSY <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC spectra (Figure 6A). Application of this technique resulted in sharper NMR signals owing to reduced transverse relaxation and rendered faster recording of the spectra possible. Thus, sample stability problems, i.e. precipitation during NMR measurements, could be overcome.

In a series of <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N correlation experiments with increasing ATP concentrations, several signals showed the typical gradual change of chemical shifts observed for fast chemical exchange on the NMR time scale. The actual chemical shift in such a spectrum represents the population average of the signal frequencies in the free and bound state, allowing the determination of the dissociation constant in a series of titration experiments. The average  $K_D$ -value for ATP from seven shifting signals in the HSQC spectrum was 7.6 (±2.4) mM. (Figure 5B). This  $K_D$ -value is in the range of published physiological concentrations for ATP in the low millimolar range [37-39].

To analyze how the resistance substitutions alter the ATP binding affinity in the full-length PR-RT enzymes we determined  $K_M$ - and  $v_{max}$ -values for ATP using varying ATP concentrations in AZTMP excision assays (Table 3). The kinetic parameters were only defined for those enzyme variants capable of excising AZTMP in the presence of ATP (Figure 2C). While  $K_M$ -values for S345T, *mt2a* and *mt2c* were comparable, significantly lower  $K_M$ -values were measured with *mt3* and *mt4*,

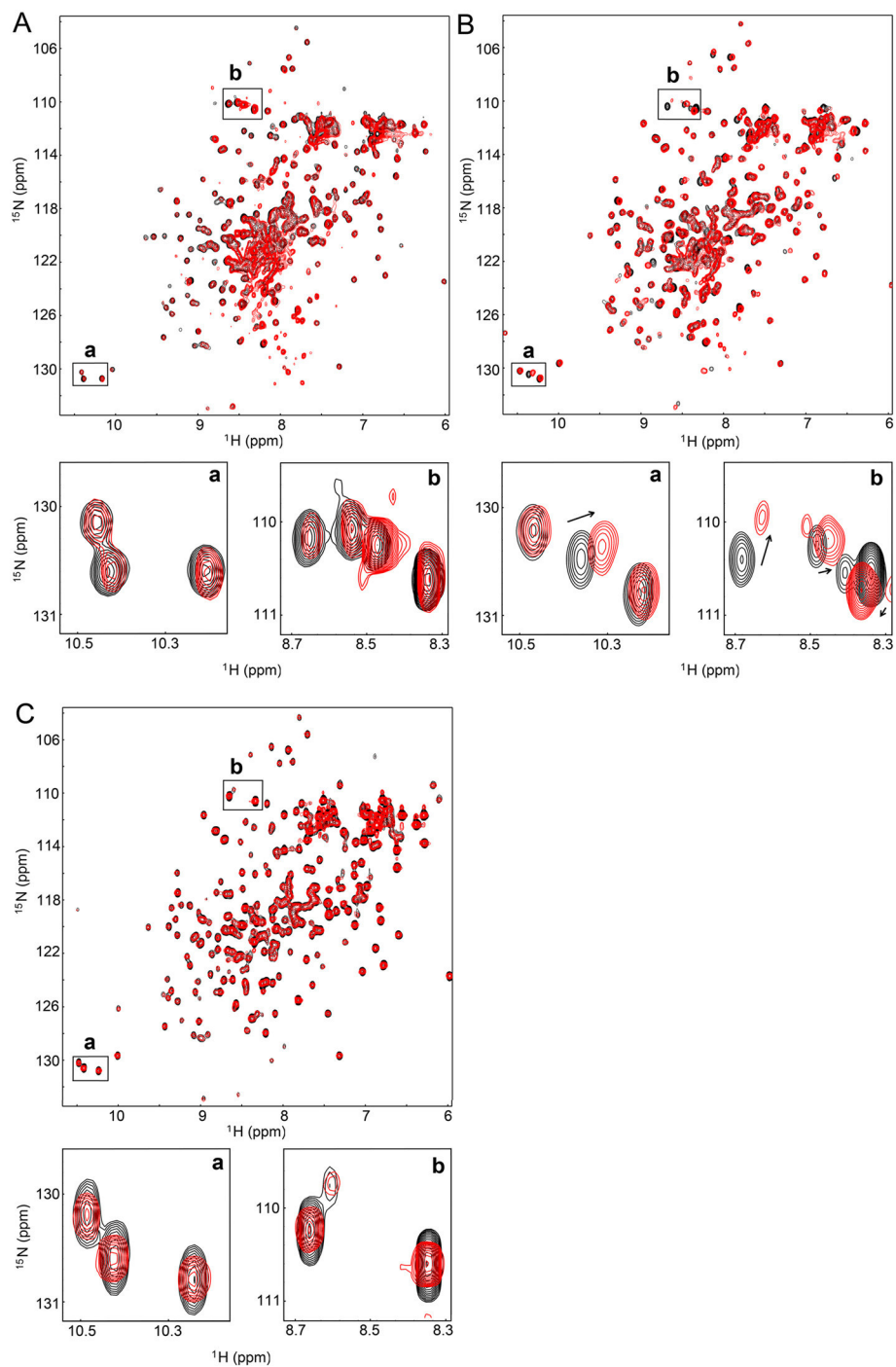
again indicating that the combination of the three exchanges K211I, S345T and E350K is necessary for high affinity ATP binding and thus for efficient AZTMP removal.

#### Conclusions

We were able to assign different functions to the residues in SFVmac RT responsible for AZT resistance. S345T is probably the first exchange since it is the only single amino acid exchange conferring moderate AZT resistance. Thus, S345T is essential for AZT resistance. It appears to make a Trp residue in the palm subdomain accessible for ATP binding by  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions of the aromatic rings, thus establishing a new ATP binding site in the enzyme variant that does not exist in the WT. Figure 7 shows a model of SFVmac RT *mt4* highlighting the localization of the seven Trp residues that are present in the fingers and palm subdomains. The spacefilling representation (Figure 7B) indicates that most of the Trp residues are located in the inner core of the enzyme and thus do not come into consideration for ATP binding. However, residue W258 is close enough to the active site as well as to the essential residue T345. Furthermore, it is not positioned in the enzyme's interior and thus might be the Trp residue qualifying for ATP binding. Our results are in strong contrast to AZT-resistant HIV-1 RT, in which a second ATP binding site is created in the enzyme (site II) ca. 10 Å away from site I, by introducing the aromatic substitution T215F/Y [15-17].

In SFVmac RT the substitution E350K improves the catalytic efficiency of dNTP incorporation, thereby compensating the reduced polymerization activity caused by K211I in *mt3* and *mt4*. K211I increases fidelity by reducing dNTP affinity, thus facilitating dissociation of a non-complementary dNTP.

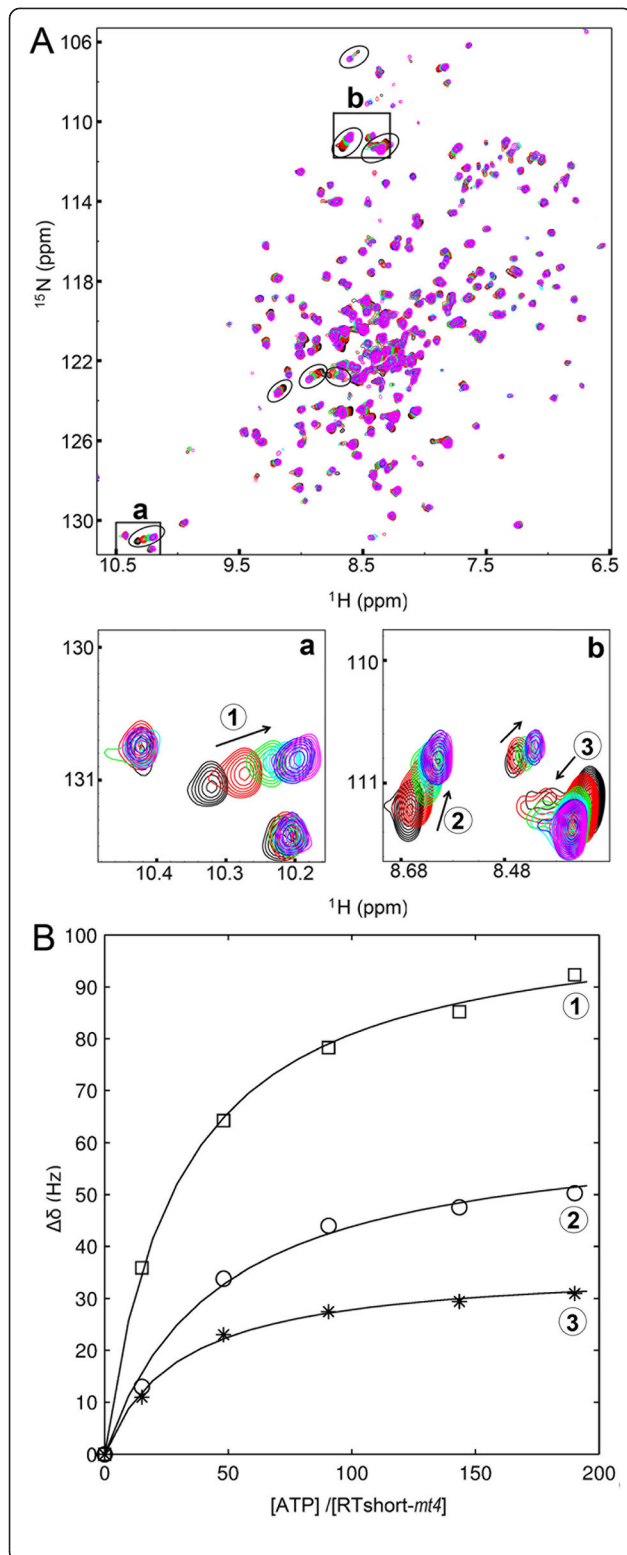
The  $K_D$ -value for ATP of RTshort-*mt4*, harboring the new ATP binding site, is ca. 7.6 mM. This is in good agreement with published cellular ATP concentrations [37-39] and the ATP concentration (5 mM) we successfully used for *in vitro* AZTMP excision experiments. In HIV-1, the binding sites for ATP and the incoming dNTP overlap [15,42]. Obviously, the affinity for ATP needs to be lower than that for the dNTP since otherwise ATP binding would inhibit polymerization in the



**Figure 5** HSQC spectra of RTshort-WT, RTshort-*mt4* and RTshort-*mt4*-T345S. Overlays of  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of RTshort proteins in the absence of ATP (black) and in the presence of 21 mM ATP (red) in binding buffer with 10%  $\text{D}_2\text{O}$  at a sample temperature of 298 K. **(A)** black: 460  $\mu\text{M}$  RTshort-WT without ATP; red: 363  $\mu\text{M}$  RTshort-WT with a 58 fold ATP excess. **(B)** black: 550  $\mu\text{M}$  RTshort-*mt4* without ATP; red: 434  $\mu\text{M}$  RTshort with a 48 fold ATP excess. **(C)** black: RTshort-*mt4*-T345S without ATP; red: 355  $\mu\text{M}$  RTshort-*mt4*-T345S with a 59 fold ATP excess

absence of AZTTP. Nevertheless, ATP binding can be achieved when AZTMP is incorporated due to pausing of the RT in the so-called pre-translocation complex in which the binding pocket for the dNTP is not accessible [16].

In addition to ATP binding, the excision mechanism further requires formation of a phosphodiester bond between ATP and the incorporated AZTMP, followed by the dissociation of the putative excision product, dinucleoside



**Figure 6 Titration of RTshort-*mt4* with ATP. (A)** Overlay of TROSY-<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC spectra of 205  $\mu$ M RTshort-*mt4* recorded at a sample temperature of 288 K during the titration with different ATP/protein ratios. Key: black: 0; red: 15; green: 48; cyan: 92; blue: 142; pink: 195. Blow-ups of the framed areas **(a)** and **(b)** are shown underneath the spectra and represent examples of significant chemical shift changes with RTshort-*mt4* and ATP. **(B)** Determination of the mean  $K_D$ -value for ATP with RTshort-*mt4*. Seven fits for normalized chemical shift changes of seven shifting residues encircled in **(A)** were used to calculate the *mean*  $K_D$ -value with standard deviation. Exemplified, fitted curves for three signal changes depicted in boxes **(a)** and **(b)** are shown as a function of the [ATP]/[RTshort-*mt4*] ratio.

tetraphosphate (AZT-P<sub>4</sub>-A) [12]. Due to its reduced affinity for nucleotides K211I might facilitate the dissociation of the AZT-P<sub>4</sub>-A, thereby improving the excision reaction in the presence of S345T. Moreover, K211I reduces viral fitness which is at least in part due to the impaired polymerization activity. This, in turn, is compensated by I224T, which improves viral fitness but is not directly involved in the AZT excision process. The amino acid exchange S345T can be achieved by a single nucleotide exchange (TCA > ACA). Therefore, moderately AZT resistant virus is created very easily. This might be the reason why the AZTMP removal pathway is favored over AZTTP discrimination. The functions of the other exchanges are important to obtain highly resistant virus, with improved fidelity and polymerization activity, combined with recovered viral fitness. Thus, although HIV-1 and SFVmac achieve AZT resistance by removal of the incorporated AZTMP, the function of the resistance mutations appear to be different.

## Methods

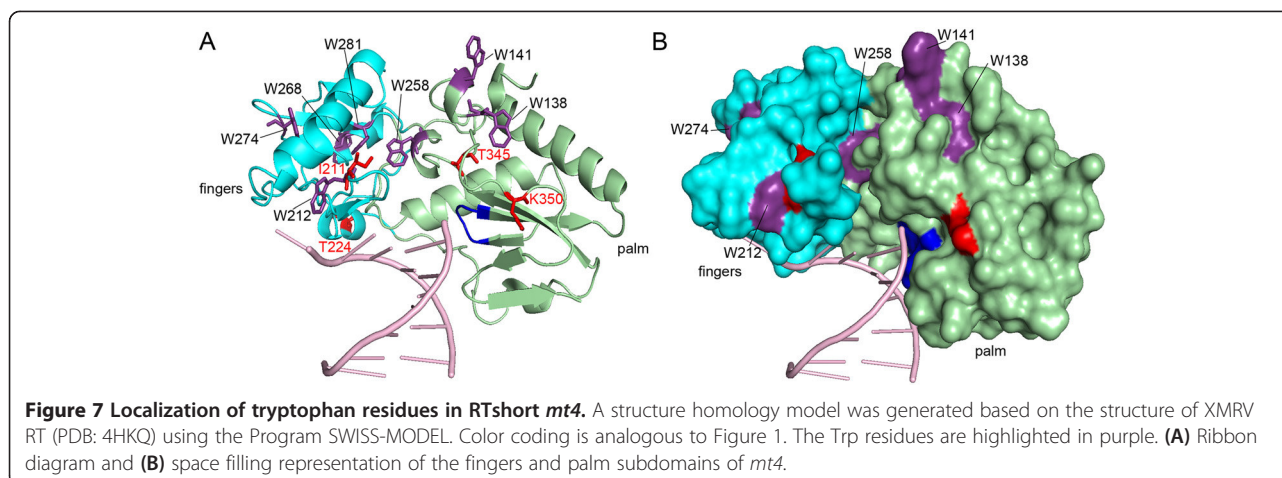
### Cloning, expression and protein purification

Construction of WT, *mt3*, and *mt4* SFVmac PR-RTs was published previously [14]. The single and double mutants (Figure 2A) were created by site-directed mutagenesis according to the QuickChange protocol from Stratagene (Heidelberg, Germany). Gene expression and protein purification of all SFVmac PR-RT variants was performed using published protocols [14].

**Table 3 Kinetic parameters for AZTMP removal by ATP in SFVmac PR-RTs**

Enzyme	$K_M$ ( $\mu$ M)	p-value	$V_{max}$ (nM/min)	p-value
S345T	811 ( $\pm$ 127)	0.004	110.7 ( $\pm$ 6.7)	0.02
<i>mt2a</i>	893 ( $\pm$ 268)	0.011	112.4 ( $\pm$ 14.7)	0.08
<i>mt2c</i>	899 ( $\pm$ 73)	0.001	108.7 ( $\pm$ 11.2)	0.06
<i>mt3</i>	142 ( $\pm$ 44)	0.226	100.5 ( $\pm$ 22.5)	0.14
<i>mt4</i>	241 ( $\pm$ 101)	-	131.2 ( $\pm$ 5.6)	-

The p-values were calculated with the unpaired *t*-test, each variant was compared with the highly resistant *mt4* variant. p-values  $\leq$  0.05 were considered significant.



SFVmac RTshort-WT, *-mt4* and *-mt4*-T345S, coding for amino acid residues 107–368 of the PR-RT, were cloned into the vector pET-GB1a (G. Stier, EMBL, Heidelberg, Germany), expressed as 6His-GB1a fusion proteins, and purified as published previously for prototype foamy virus (PFV) RNase H [43]. In brief, for  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC experiments, gene expression in *Escherichia coli* Rosetta DE3 (Novagen/EMD Biosciences; Darmstadt, Deutschland) was induced with 1 mM isopropylthiogalactoside (IPTG) at an optical density at 600 nm of 0.7 at 20°C in M9 medium supplemented with trace element solution TS2 [44,45], 1 x MEM vitamin solution (Gibco, Karlsruhe, Germany), 1.5 g/l  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Cambridge Isotope laboratories, Inc., Andover, MA, USA), and 2.5% of  $^{15}\text{N}$  labeled rich medium (Silantes, Munich, Germany). In order to obtain  $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ - and  $^2\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ - labeled RTshort-*mt4* for the TROSY  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC pre-cultures were grown as above or additionally with 4 g/l  $^{13}\text{C}$ -glucose (Euriso-Top, GIF-SUR-YVETTE, France), using a stepwise increase of  $\text{D}_2\text{O}$  concentrations from 50% and 75% up to a final concentration of 100%. After cell lysis the proteins were purified by Ni-affinity chromatography. The 6His-GB1a-tag was cleaved off by tobacco etch virus (TEV) protease and the tag was removed using a second Ni-affinity chromatography. The free RTshort variants were collected in the flow through.

#### Quantitative polymerization assay

Measurements of RNA-dependent DNA polymerase activity to determine the specific activity (SPAC) were carried out on a poly(rA)/oligo(dT)<sub>15</sub> substrate (0.2 U/ml) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) as described previously [14]. Under these conditions 1 unit (U) of enzyme activity enables the incorporation of 1 nmol TMP into poly(rA)/oligo(dT)<sub>15</sub> after 10 min at 37°C.

To determine  $K_M$ - and  $v_{\max}$ - values, different dTTP concentrations of 25, 50, 75, 125, 250, 600  $\mu\text{M}$  were used

in the polymerization reactions and data were fitted to the Michaelis-Menten equation (1) using the fitting program GraFit 5.0.12 (Erithacus Software limited, West Sussex, UK):

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [\text{dTTP}]}{K_M + [\text{dTTP}]} \quad (1)$$

#### 5' endlabeling of primers

5'  $^{32}\text{P}$ -endlabeling of the P<sub>30</sub> primer (5'-GCTGTAATG GCGTCCCTGTTCGGGCGCCTC) (biomers.net; Ulm, Germany) as well as the corresponding AZTMP terminated P<sub>30</sub> primer (P<sub>30</sub>-AZTMP) was done as described previously [3,14].

#### Polymerization initiation reactions

Polymerization assays were performed using a 5'  $^{32}\text{P}$  endlabeled P<sub>30</sub>/T<sub>50</sub> substrate (template 5'-GCTGTGGA AAATCTCATGCAGAGGCGCCCGAACAGGGACGC CATTACAGC), 250  $\mu\text{M}$  of each dNTP and PR-RT as described previously [4].

#### Qualitative RNase H assay

The RNA template (5' AACAGAGUGCGACACCUG AUUCCAU) (Metabion GmbH, Planegg-Martinsried, Germany) was  $^{32}\text{P}$ -labeled at its 5' end and hybridized to a DNA primer (5' TGGAATCAGGTGTCGCACTCTG) (Metabion GmbH, Planegg-Martinsried, Germany) using a 1.2 fold excess of the DNA [3,14]. RNase H reactions were performed with 240 nM RNA<sub>25</sub>/DNA<sub>22</sub> hybrid and 50 nM RT-PR for 2 min at 25°C. Reactions were stopped by the addition of an equal volume of urea loading buffer (0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol, 8 M urea, 89 mM Tris/HCl pH 8.3, 89 mM boracic acid) supplemented with 50 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA). Reaction products were separated by denaturing gel electrophoresis (10% polyacrylamide/8 M urea

gels). Products were visualized using a phosphoimaging device (Dürr Medical CR 35 Bio; Bietigheim-Bissingen, Germany) and quantified densitometrically with the software AIDA Image Analyzer V.450 (raytest, Staubenhardt, Germany).

#### Fluorescence equilibrium titrations

To determine dissociation constants ( $K_D$ ) for DNA binding, changes in anisotropy were measured by fluorescence equilibrium titrations with 5 nM of a 24/40-mer DNA/DNA (primer 5'-ATCACCAGGAGAGGGGAAA GCGGA, template 5'-DY647-CTAATTCGCTTTCCTCTCTCTGGTGATCCTTTCATCC) (biomers.net GmbH, Ulm, Germany) and increasing amounts of enzyme at 25°C.  $K_D$ -values were calculated via non-linear curve fitting of the anisotropy data to a two component binding equation as described previously [43].

#### AZTMP excision

The  $P_{30}$  DNA primer was terminated with AZTTP as described [14]. Subsequently, the resulting  $P_{30}$ -AZTMP was purified via gel electrophoresis on a 20% denaturing polyacrylamide/8 M urea gel followed by UV shadowing to identify the DNA. After cutting out of the correct band, the DNA was electro-eluted, dialyzed against  $H_2O$  and lyophilized. 100 pmoles of 5'- $^{32}P$  endlabeled  $P_{30}$ -AZTMP DNA were hybridized to a 1.2-fold molar excess of the  $T_{50}$  template DNA as described [4,14]. 5 nM  $P_{30}$ -AZTMP/ $T_{50}$ , 0.02 U of pyrophosphatase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) and 5 mM ATP (Jena Bioscience, Jena, Germany) were preincubated for 5 min at 37°C in reaction buffer in a total volume of 10  $\mu$ l. AZTMP excision reactions were started by the addition of 320 nM enzyme, carried out for 20 min at 37°C and stopped by adding 10  $\mu$ l of urea loading buffer with 25 mM EDTA. Reaction products were separated by denaturing gel electrophoresis and quantified as described above.

To determine the  $K_M$ - and  $v_{max}$ -values for ATP excision identical conditions were applied. However, ATP concentrations were varied, using 0.0, 0.15, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 or 3 mM ATP.  $K_M$ - and  $v_{max}$ -values were obtained using Hanes-Woolf linearization of the Michaelis-Menten equation.

#### Polymerase fidelity measurements

A 50mer DNA template ( $T_{50}$ dA) (5'- GCTGTGGCCG GTCTCTTG TAGAGGCGCCCGAACAGGGACGCCA TTACAGC) was hybridized to a 5'  $^{32}P$ -labeled DNA primer ( $P_{30}$ ) (5'-GCTCTAATGGCGTCCCTGTTCGG GCGCCTC) (biomers.net; Ulm, Germany) [4]. 20 nM of the  $T_{50}$ dA/ $P_{30}$  substrate were pre-incubated for 2 min at 37°C with 0.08 U of pyrophosphatase (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) and

1.25 mM dATP (mismatch) or dTTP (match) in reaction buffer. Reactions were started by the addition of 1.25  $\mu$ M enzyme and stopped after 12 min with an equal volume of urea loading buffer (see above). The reaction products were separated via denaturing gel electrophoresis (8% polyacrylamide/8 M urea gels) and analyzed as described above. Since the bands above  $P_{31}$  all comprise the first correct dTTP incorporation they were also included in quantification of the primer extensions. Mean values and standard deviations of at least three independent experiments were analyzed in unpaired *t*-tests. Significant differences to the WT enzyme are indicated as p-values in Additional file 1: Table S1 and in Figure 4C by asterisks.

#### ATP binding experiments

2D [ $^1H$ - $^{15}N$ ] HSQC experiments were recorded in the absence and presence of ATP (21 mM) (Jena Bioscience, Jena, Germany) with RTshort-WT, RTshort-*mt4* and RTshort-*mt4*-T345S in binding buffer [50 mM Tris/HCl pH 6.7<sub>25°C</sub>, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT] with 10% (v/v) D<sub>2</sub>O at 298 K. To determine the  $K_D$ -value for ATP of RTshort-*mt4*, transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY)  $^1H/^{15}N$ -HSQC experiments [46,47] were done with 205  $\mu$ M of deuterated and  $^{15}N$  labeled  $^2H/^{15}N$  RTshort-*mt4* in binding buffer.  $^1H$  back-exchange of amide protons was achieved by overnight dialysis of the protein against binding buffer at 4°C. Comparison with spectra of  $^{15}N$ -labeled protein demonstrated the nearly complete back-exchange of amide protons. A TROSY  $^1H/^{15}N$ -HSQC spectrum of RTshort-*mt4* was recorded without ATP and after the addition of ATP at various molar ratios as indicated in Figure 6. The  $K_D$ -values for ATP of seven different shifting signals were determined by fitting the chemical shift changes of the TROSY  $^1H/^{15}N$ -HSQCs to a two-state model (equation 2).  $\delta_{obs}$ ,  $\delta_P$  and  $\delta_{PL}$  are the chemical shifts for the protein in the ATP-bound and -unbound state, the free RTshort-*mt4*, and the ATP/RTshort-*mt4* complex, respectively.  $[P_0]$  is the total protein concentration and  $r$  describes the ration of ATP and protein concentration,  $[ATP]/[RTshort-*mt4*]$ .

$$\Delta\delta_{obs} = \delta_P + (\delta_{PL} - \delta_P) \cdot$$

$$\left[ \frac{\{K_D + (1+r)[P_0]\} - \sqrt{\{K_D + (1-r)[P_0]\}^2 - 4[P_0]^2 r}}{2[P_0]} \right] \quad (2)$$

The mean  $K_D$ -value with standard deviation was calculated using the independent fits of the seven shifting residues. TROSY based triple resonance experiments [48] were recorded for protein backbone assignment using a  $^2H/^{13}C/^{15}N$  labeled sample. All spectra were acquired

on Bruker Avance 700 and 800 MHz spectrometers equipped with cryogenically cooled probes. The NMR data was processed applying in house protocols and analyzed with the program NMRView (B. A. Johnson; Merck, Whitehouse Station, NJ, USA).

## Additional file

**Additional file 1: Table S1.** Fidelity of PR-RTs. Quantification of the primer extension reactions with a templated (match) and non-templated (mismatch) dNTP represented in Figure 3.

## Abbreviations

AZT: Azidothymidine; FV: Foamy virus; GB1a: Immunoglobulin binding domain B1 of streptococcal protein G; HIV-1: Human immunodeficiency virus type 1; IN: Integrase; IPTG: Isopropyl-thiogalactoside;  $K_D$ : Dissociation constant; NRTI: Nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NtRTI: Nucleotide reverse transcriptase inhibitor; SFVmac: Simian foamy virus from macaques; MoMLV: Moloney murine leukemia virus, PR, protease; RNase H: Ribonuclease H; P/T: Primer/template; RT: Reverse transcriptase; TEV: Tobacco etch virus.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

BMW conceived and coordinated the study. AS performed the experiments. BMW, AS and KS analyzed the data. BMW and AS wrote the paper. PR provided conceptual input and financial support. All authors read and approved the manuscript.

## Acknowledgement

The authors thank Ulrike Persau and Ramona Heissmann for excellent technical assistance, and Dr. Maximilian J. Hartl for helpful discussions. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant number Wo630/7-3), the University of Bayreuth, the Bavarian International Graduate School of Science (BIGSS), the Bayreuth Graduate School of Mathematical and Natural Sciences (BayNat), and the Stabsabteilung Chancengleichheit, University of Bayreuth.

Received: 22 September 2014 Accepted: 27 January 2015

Published online: 22 February 2015

## References

- Goff SP. Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1999–2069.
- Linial ML, Eastman SW. Particle assembly and genome packaging. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2003;277:89–110.
- Hartl MJ, Mayr F, Rethwilm A, Wöhrl BM. Biophysical and enzymatic properties of the simian and prototype foamy virus reverse transcriptases. *Retrovirology*. 2010;7:5.
- Schneider A, Peter D, Schmitt J, Leo B, Richter F, Rösch P, et al. Structural requirements for enzymatic activities of foamy virus protease-reverse transcriptase. *Proteins*. 2014;82:375–85.
- Hartl MJ, Schweimer K, Reger MH, Schwarzingler S, Bodem J, Rösch P, et al. Formation of transient dimers by a retroviral protease. *Biochem J*. 2010;427:197–203.
- Hartl MJ, Wöhrl BM, Rösch P, Schweimer K. The solution structure of the simian foamy virus protease reveals a monomeric protein. *J Mol Biol*. 2008;381:141–9.
- Hartl MJ, Bodem J, Jochheim F, Rethwilm A, Rösch P, Wöhrl BM. Regulation of foamy virus protease activity by viral RNA - a novel and unique mechanism among retroviruses. *J Virol*. 2011;85:4462–9.
- Lee CC, Ye F, Tarantal AF. Comparison of growth and differentiation of fetal and adult rhesus monkey mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2006;15:209–20.
- Moebes A, Enssle J, Bieniasz PD, Heinkelmann M, Lindemann D, Bock M, et al. Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol*. 1997;71:7305–11.
- Rosenblum LL, Patton G, Grigg AR, Frater AJ, Cain D, Erlwein O, et al. Differential susceptibility of retroviruses to nucleoside analogues. *Antivir Chem Chemother*. 2001;12:91–7.
- Kretzschmar B, Nowrouzi A, Hartl MJ, Gärtner K, Wiktorowicz T, Herchenröder O, et al. AZT-resistant foamy virus. *Virology*. 2008;370:151–7.
- Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell*. 1999;4:35–43.
- Meyer PR, Matsuura SE, So AG, Scott WA. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:13471–6.
- Hartl MJ, Kretzschmar B, Frohn A, Nowrouzi A, Rethwilm A, Wöhrl BM. AZT resistance of simian foamy virus reverse transcriptase is based on the excision of AZTMP in the presence of ATP. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:1009–16.
- Tu X, Das K, Han Q, Bauman JD, Clark Jr AD, Hou X, et al. Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17:1202–9.
- Sarafianos SG, Clark Jr AD, Das K, Tuske S, Birktoft JJ, Ilankumaran P, et al. Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *EMBO J*. 2002;21:6614–24.
- Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol*. 2001;75:4832–42.
- Larder BA, Kemp SD. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science*. 1989;246:1155–8.
- Kellam P, Boucher CA, Larder BA. Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:1934–8.
- Arion D, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): Increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry*. 1998;37:15908–17.
- Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2002;76:3248–56.
- Nowak E, Potrzebowski W, Konarev PV, Rausch JW, Bona MK, Svergun DI, et al. Structural analysis of monomeric retroviral reverse transcriptase in complex with an RNA/DNA hybrid. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(6):3874–87.
- Steitz TA. DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem* 1999;274:17395–17398.
- Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*. 1992;256:1783–90.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006;22:195–201.
- Das K, Bandwar RP, White KL, Feng JY, Sarafianos SG, Tuske S, et al. Structural basis for the role of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase polymerization, excision antagonism, and tenofovir resistance. *J Biol Chem*. 2009;284:35092–100.
- Garforth SJ, Domaal RA, Lwatula C, Landau MJ, Meyer AJ, Anderson KS, et al. K65R and K65A substitutions in HIV-1 reverse transcriptase enhance polymerase fidelity by decreasing both dNTP misinsertion and mispaired primer extension efficiencies. *J Mol Biol*. 2010;401:33–44.
- Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Boyer PL, Hughes SH, Coffin JM, Jere A, et al. HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain mutations reduce template RNA degradation and enhance AZT excision. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:10943–8.
- Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Barr R, Pathak VK. Mutations in human immunodeficiency virus type 1 RNase H primer grip enhance 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *J Virol*. 2007;81:6837–45.
- Nikolenko GN, Delviks-Frankenberry KA, Palmer S, Maldarelli F, Fivash Jr MJ, Coffin JM, et al. Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:317–22.
- Shah FS, Curr KA, Hamburg ME, Parniak M, Mitsuya H, Arnez JG, et al. Differential influence of nucleoside analog-resistance mutations K65R and L74V on the overall mutation rate and error specificity of human

- immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27037–44.
32. Boyer PL, Hughes SH. Analysis of mutations at position 184 in reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1624–8.
  33. Back NK, Nijhuis M, Keulen W, Boucher CA, Oude Essink BO, van Kuilenburg AB, et al. Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. *EMBO J.* 1996;15:4040–9.
  34. Oude Essink BB, Back NK, Berkhout B. Increased polymerase fidelity of the 3TC-resistant variants of HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3212–7.
  35. Sluis-Cremer N, Arion D, Kaushik N, Lim H, Parniak MA. Mutational analysis of Lys65 of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem J.* 2000;348(Pt 1):77–82.
  36. Georgiadis MM, Jessen SM, Ogata CM, Telesnitsky A, Goff SP, Hendrickson WA. Mechanistic implications from the structure of a catalytic fragment of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Structure.* 1995;3:879–92.
  37. Gavegnano C, Kennedy EM, Kim B, Schinazi RF. The impact of macrophage nucleotide pools on HIV-1 reverse transcription, viral replication, and the development of novel antiviral agents. *Mol Biol Int.* 2012;2012:625983.
  38. Kennedy HJ, Pouli AE, Ainscow EK, Jouaville LS, Rizzuto R, Rutter GA. Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet beta-cells. potential role for strategically located mitochondria. *J Biol Chem.* 1999;274:13281–91.
  39. Wang RH, Tao L, Trumbore MW, Berger SL. Turnover of the acyl phosphates of human and murine prothymosin alpha in vivo. *J Biol Chem.* 1997;272:26405–12.
  40. Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer III AG, Rance M, Skelton NJ. *Protein NMR spectroscopy: principles and practice.* Boston: Academic; 2007.
  41. Wishart DS, Sykes BD, Richards FM. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J Mol Biol.* 1991;222:311–33.
  42. Huang HF, Chopra R, Verdine GV, Harrison SC. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: Implications for drug design. *Science.* 1998;282:1669–75.
  43. Leo B, Hartl MJ, Schweimer K, Mayr F, Wöhrl BM. Insights into the structure and activity of prototype foamy virus RNase H. *Retrovirology.* 2012;9:14.
  44. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning - a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994.
  45. Meyer O, Schlegel HG. Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1983;37:277–310.
  46. Pervushin K. Impact of transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) on NMR as a technique in structural biology. *Q Rev Biophys.* 2000;33:161–97.
  47. Pervushin K, Riek R, Wider G, Wuthrich K. Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:12366–71.
  48. Salzmann M, Pervushin K, Wider G, Senn H, Wuthrich K. TROSY in triple-resonance experiments: New perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:13585–90.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





## Supplementary Information

**Table S1. Fidelity of PR-RTs**

Quantification of the primer extension reactions with a templated (match) and non-templated (mismatch) dNTP represented in Figure 3.

enzyme	mismatch extension (%)	p-value	templated extension (%)	p-value
<b>WT</b>	32.6 ( $\pm$ 2.4)	-	75.9 ( $\pm$ 9.2)	-
<b>K211I</b>	13.9 ( $\pm$ 4.0)	0.0005	75.8 ( $\pm$ 6.7)	0.99
<b>I224T</b>	29.2 ( $\pm$ 3.8)	0.19	77.4 ( $\pm$ 10.6)	0.86
<b>S345T</b>	45.2 ( $\pm$ 7.1)	0.03	78.8 ( $\pm$ 8.7)	0.71
<b>E350K</b>	42.5 ( $\pm$ 6.4)	0.05	78.6 ( $\pm$ 9.8)	0.74
<i>mt2a</i>	18.9 ( $\pm$ 4.4)	0.004	75.4 ( $\pm$ 7.0)	0.94
<i>mt2b</i>	20.1 ( $\pm$ 6.8)	0.03	74.2 ( $\pm$ 8.4)	0.82
<i>mt2c</i>	45.7 ( $\pm$ 16.3)	0.21	78.7 ( $\pm$ 6.6)	0.69
<i>mt3</i>	31.3 ( $\pm$ 2.8)	0.51	77.3 ( $\pm$ 6.6)	0.83
<i>mt4</i>	27.2 ( $\pm$ 4.4)	0.09	75.0 ( $\pm$ 8.9)	0.91

p-values  $\leq$ 0.05 differ significantly from the WT.



## 10 Einzelarbeit D

Angela Corona<sup>§</sup>, Anna Schneider<sup>§</sup>, Kristian Schweimer, Paul Rösch, Birgitta M. Wöhrle, Enzo Tramontano (2014): Inhibition of foamy virus reverse transcriptase by human immunodeficiency virus type 1 ribonuclease H inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**: 4086-4093.

<sup>§</sup>A. Corona and A. Schneider contributed equally to this work.



# Inhibition of Foamy Virus Reverse Transcriptase by Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNase H Inhibitors

Angela Corona,<sup>a</sup> Anna Schneider,<sup>b</sup> Kristian Schweimer,<sup>b</sup> Paul Rösch,<sup>b</sup> Birgitta M. Wöhrl,<sup>b</sup> Enzo Tramontano<sup>a</sup>

University of Cagliari, Department of Life and Environmental Sciences, Cittadella di Monserrato, Monserrato (Cagliari), Italy<sup>a</sup>; Universität Bayreuth, Lehrstuhl Biopolymere, Bayreuth, Germany<sup>b</sup>

**RNase H plays an essential role in the replication of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Therefore, it is a promising target for drug development. However, the identification of HIV-1 RNase H inhibitors (RHIs) has been hampered by the open morphology of its active site, the limited number of available RNase H crystal structures in complex with inhibitors, and the fact that, due to the high concentrations of Mg<sup>2+</sup> needed for protein stability, HIV-1 RNase H is not suitable for nuclear magnetic resonance (NMR) inhibitor studies. We recently showed that the RNase H domains of HIV-1 and prototype foamy virus (PFV) reverse transcriptases (RTs) exhibit a high degree of structural similarity. Thus, we examined whether PFV RNase H can serve as an HIV-1 RNase H model for inhibitor interaction studies. Five HIV-1 RHIs inhibited PFV RNase H activity at low-micromolar concentrations similar to those of HIV-1 RNase H, suggesting pocket similarity of the RNase H domains. NMR titration experiments with the PFV RNase H domain and the RHI RDS1643 (6-[1-(4-fluorophenyl)methyl-1H-pyrrol-2-yl)]-2,4-dioxo-5-hexenoic acid ethyl ester) were performed to determine its binding site. Based on these results and previous data, *in silico* docking analysis showed a putative RDS1643 binding region that reaches into the PFV RNase H active site. Structural overlays were performed with HIV-1 and PFV RNase H to propose the RDS1643 binding site in HIV-1 RNase H. Our results suggest that this approach can be used to establish PFV RNase H as a model system for HIV-1 RNase H in order to identify putative inhibitor binding sites in HIV-1 RNase H.**

In foamy viruses (FVs), the mature reverse transcriptase (RT) harbors the protease (PR) at its N terminus, leading to a multifunctional enzyme that carries out the functions of PR and RT, including the activities of RT-associated RNA-dependent DNA polymerase (RDDP) and RNase H (1–3). In contrast to the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RT heterodimer (p66/p51), prototype FV (PFV) PR-RT has been shown to be monomeric and able to catalyze all RT-related functions (3), while PR activation requires dimer formation of the PR domain via the binding of PR-RT to a specific element on the viral RNA, called the protease-activating RNA motif (PARM) (4, 5). Hence, for the retrotranscription functions, PFV PR-RT differs from alpharetroviral and lentiviral RTs (including HIV-1 RT), which are dimeric, and it is similar to the gammaretroviral RTs that are monomeric (6). In addition, the PFV RNase H domain possesses a basic protrusion, including a basic loop and the so-called C-helix, which is important for activity and substrate binding and is absent in the HIV-1 RNase H domain (7, 8). In HIV-1 RT, the basic protrusion is absent; instead, a loop derived from the connection domain of the p66 subunit fulfills a similar function (7, 8). Therefore, in contrast to FV, the free HIV-1 RNase H domain, which lacks the loop, is not enzymatically active (7–11).

In the search for effective drugs to treat HIV-1-infected patients, many HIV-1 RT inhibitors have been identified in the last 25 years (12). They are generally divided into nucleoside analogue RT inhibitors (NRTI), nonnucleoside analogue RT inhibitors (NNRTI), and RNase H inhibitors (RHI) (12–15); however, no RNase H inhibitor is yet in clinical use.

HIV-1 RNase H is an attractive new target for drug discovery, since its enzyme activity is essential for viral replication. During the last 10 years, several classes of HIV-1 RHIs have been identified (12–15). The design of potent RHIs has proven difficult due to the open morphology of the RNase H active site (16) and the limited

number of available RNase H crystal structures in complex with inhibitors (17–21). In addition, given the fact that under nuclear magnetic resonance (NMR) conditions, the free HIV-1 RNase H domain is stable only in the presence of 20 to 80 mM MgCl<sub>2</sub>, it is difficult to perform binding studies with inhibitors that interact with magnesium ions (22–24). Furthermore, since the free HIV-1 RNase H domain is not active, a chimeric HIV-1 RNase H domain harboring the substrate binding loop from *Escherichia coli* RNase H is often used for inhibitor testing (20, 24–26).

Therefore, we wanted to investigate whether HIV-1 RHIs are also able to inhibit PFV RNase H. In fact, structural alignments of the two RNase H domains reveal that with the exception of the basic protrusion, the overall three-dimensional structures of HIV-1 and PFV RNase H are highly homologous (8, 12, 27). If PFV RNase H were inhibited in a similar fashion, it could serve as an HIV-1 RNase H model for inhibitor interaction studies. Moreover, we have shown that FV RNase H is soluble and stable at 6 mM MgCl<sub>2</sub> (7, 8). This makes the RNase H suitable for inhibitor binding studies by NMR spectroscopy, especially since several RHIs are Mg<sup>2+</sup> ion binding compounds, i.e., diketo acids (28).

Received 13 January 2014 Returned for modification 20 February 2014

Accepted 29 April 2014

Published ahead of print 5 May 2014

Address correspondence to Birgitta M. Wöhrl, birgitta.woehrl@uni-bayreuth.de, or Enzo Tramontano, tramon@unica.it.

A.C. and A.S. contributed equally to this work.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00056-14>.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00056-14

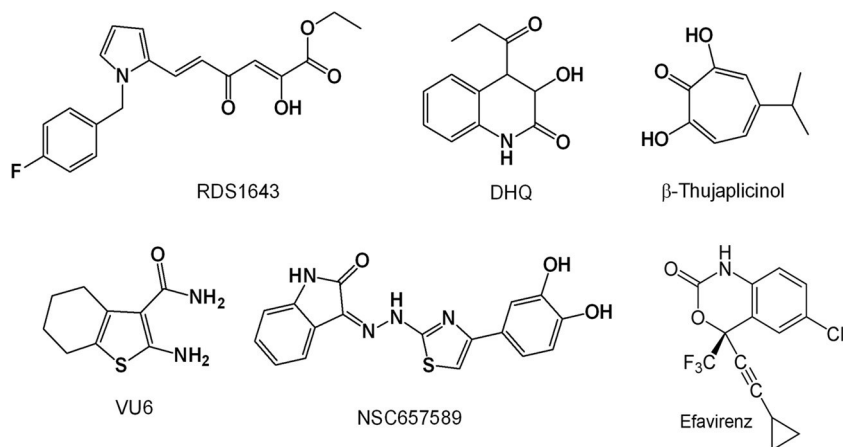


FIG 1 Chemical structures of HIV-1 RHIs and the NNRTI efavirenz.

We first chose five different HIV-1 RHIs that inhibit HIV-1 RT by binding at different RT pockets (Fig. 1) and the NNRTI efavirenz as a control to test their effects on FV PR-RT in enzyme activity assays. Due to its relatively high solubility in water, the inhibitor RDS1643 that impaired FV RNase H activity appeared to be suitable for NMR spectroscopy. NMR titration experiments identified its putative binding site in the PFV RNase H domain. Sequence and structure alignments with HIV-1 RNase H and docking experiments were used to reveal the corresponding binding site in HIV-1 RNase H. Our data suggest that PFV RNase H can be used as a model for HIV-1 RNase H inhibitor binding.

## MATERIALS AND METHODS

**Protein purifications.** The purification of PFV PR-RT and  $^{15}\text{N}$ -labeled PFV RNase H was performed as described previously (3, 7).

**RNase H polymerase-independent cleavage assay.** The PFV RT-associated RNase H activity was measured in a 100- $\mu\text{l}$  reaction volume containing 50 mM Tris HCl (pH 8.1), 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM dithiothreitol (DTT), 80 mM KCl, 0.25  $\mu\text{M}$  hybrid RNA/DNA (5'-GTTTTCTTTTCC CCCCTGAC-3'-fluorescein, 5'-CAAAAGAAAAGGGGGGACUG-3'-dabcyl), and 2 nM PFV RT. The reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C, the reaction was stopped by adding EDTA, and the products were measured with a Victor3 (PerkinElmer) plate reader at 490/528 nm.

**DNA polymerase assay.** The PFV RT-associated RDDP activity was measured in a 50- $\mu\text{l}$  volume containing 60 mM Tris-HCl (pH 8.1), 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 60 mM KCl, 13 mM DTT, 100  $\mu\text{M}$  dTTP, 5 nM PFV RT, and 2.5  $\mu\text{M}$  poly(A)-oligo(dT) (EnzChek Invitrogen). The reaction mixture was incubated for 30 min at 37°C. The enzymatic reaction was stopped by adding EDTA. The reaction products were detected by the addition of PicoGreen and measured with a Victor3 (PerkinElmer) plate reader at 502/523 nm.

**Compounds.** RDS1643 was kindly provided by Simona Di Santo, University of Rome La Sapienza, Italy; 2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophene-3-carboxamide (VU6) and 2,7-dihydroxy-4-isopropyl-cyclohepta-2,4,6-triene ( $\beta$ -thujaplicinol) were kindly provided by Stuart Le Grice, National Cancer Institute (NCI), USA; (Z)-3-(2-(4-(3,4-dihydroxyphenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)indolin-2-one (NSC657589) was obtained from the NCI repository; and 3-hydroxy-4-propionyl-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (DHQ) was kindly provided by Philippe Cotelle, University of Lille, France. Efavirenz was obtained from Elias Maccioni, University of Caligari, Italy.

**NMR analyses.** Standard nuclear magnetic resonance (NMR) heteronuclear single quantum coherence (HSQC) experiments were recorded using 50 to 80  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled PFV RNase H in 5 mM sodium phosphate

(pH 7.0), 100 mM NaCl, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM DTT, 10% (vol/vol)  $\text{D}_2\text{O}$ , and 6% deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO) at 25°C on Bruker Avance 700 and 800 MHz spectrometers partially equipped with a cryogenically cooled probe. In-house protocols were used to process the NMR data, and the program NMRView was utilized for analysis (B.A. Johnson; Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). The inhibitors were dissolved in 100% deuterated DMSO to a final concentration of 100 mM and added at the concentrations indicated in Results and Discussion. The control HSQC spectra of PFV RNase H at various concentrations of deuterated DMSO were recorded for each titration step. The final DMSO concentrations for RDS1643 did not exceed 11%.

Changes in the chemical shifts were expressed by calculating the weighted geometric average (equation 1,  $c_{15\text{N}} = 0.1$ , of chemical shifts of  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  spins). A chemical shift change with a weighted geometric average of  $\geq 0.02$  ppm was considered significant.

$$\Delta_{\text{norm}} = \sqrt{\Delta\delta_{1\text{H}}^2 + (c_{15\text{N}} \times \Delta\delta_{15\text{N}})^2} \quad (1)$$

**Inhibitor docking.** Docking experiments were performed using the program AutoDock Vina (29). Nonpolar hydrogen atoms were removed from both protein and ligand and saved in a PDBQT format. A grid box was set with  $20 \times 36 \times 28$  points in  $x, y, z$  direction and  $-8.5, -18.0, 7.0$  grid center for PFV RNase H (Protein Data Bank identification no. [PDB ID] 2LSN). The grid box included the active-site residues and the adjacent residues exhibiting significant chemical shift changes. These parameters were saved in a configuration text file (config.txt), followed by autodocking. The results generated were visualized in PyMOL. Among the inhibitor binding orientations obtained, the orientation that fit best to the NMR data was chosen.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Inhibition of PFV PR-RT enzyme activities.** For the analysis of FV PR-RT inhibition, we chose the diketo acid derivative 6-[1-(4-fluorophenyl)methyl-1H-pyrrol-2-yl]-2,4-dioxo-5-hexenoic acid ethyl ester (RDS1643) (28), 3-hydroxy-4-propionyl-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (DHQ) (30), and the natural product 2,7-dihydroxy-4-isopropyl-cyclohepta-2,4,6-triene ( $\beta$ -thujaplicinol) (31), which were reported to inhibit HIV-1 RNase H by binding the two divalent  $\text{Mg}^{2+}$  ions in the catalytic site. We also chose the vinylogous urea derivative 2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophene-3-carboxamide (VU6), which was reported to inhibit HIV-1 RNase H by interacting with a pocket located at the junction between the p51 subunit thumb subdomain and the p66 RNase H domain, possibly affecting the conformation of the adjacent p66 RNase H domain (32), and the hydrazonoin-dolin-2-one de-

TABLE 1 PFV PR-RT inhibition by HIV-1 RT RHIs

Compound	Mean $\pm$ SD IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) for <sup>a</sup> :			
	PFV PR-RT		HIV-1 RT	
	RNase H	RDDP	RNase H	RDDP
RDS1643	7.6 $\pm$ 2.0	5.2 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 1.5	>100
DHQ	41.0 $\pm$ 8.0	41.0 $\pm$ 12.0	16.0 $\pm$ 4.0	>100
$\beta$ -Thujaplicinol	0.3 $\pm$ 0.1	>100	0.22 $\pm$ 0.03	>100
VU6	6.5 $\pm$ 0.4	15.2 $\pm$ 1.8	18.7 $\pm$ 4.8	>100
NSC657589	1.7 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 1.3	7.4 $\pm$ 1.7
Efavirenz	>20	>20	>20	0.015 $\pm$ 0.005

<sup>a</sup> Compound concentration required to inhibit RT-associated RNase H activity by 50% and compound concentration required to reduce RT-associated RDDP activity by 50%, respectively. The results were calculated from  $\geq 3$  independent experiments.

rivative, (Z)-3-(2-(4-(3,4-dihydroxyphenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)indolin-2-one (NSC657589), which was shown to inhibit both HIV-1 RT-associated RDDP and RNase H activities, possibly by binding to a site located in a region between the polymerase catalytic aspartate triad (Asp110, Asp185, Asp186) and the NNRTI pocket, hence contiguous to the NNRTI pocket but different from it (33). Figure 1 shows the chemical structures of the inhibitors used in this study. When these HIV-1 RHIs were tested

on PFV PR-RT in biochemical assays using the methods previously described for HIV-1 RT-associated RNase H and polymerase functions (34–36) and the reaction conditions previously optimized for PFV PR-RT (3), we observed that all selected RHIs inhibited the PFV PR-RT (Table 1 and Fig. 2). In particular, the metal binding catalytic site binder RHIs, RDS1643, DHQ, and  $\beta$ -thujaplicinol, inhibited the PFV PR-RT RNase H activity, with 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>s) comparable to the ones obtained for HIV-1 RT, with the exception of DHQ, which was 2.5-fold-less potent on PFV PR-RT than on HIV-1 RT. Unexpectedly, while RDS1643 and DHQ have been reported to be selective for the HIV-1 RNase H function (Table 1), they also inhibited the PFV PR-RT-associated RDDP activity with the same potency shown for the RNase H function (Fig. 2). In contrast,  $\beta$ -thujaplicinol was inactive on the associated RDDP activities of both enzymes (Table 1 and Fig. 2). On one hand, these results may indicate that RDS1643 and DHQ also bind the Mg<sup>2+</sup> ions in the PFV PR-RT DNA polymerase (DP) site, while  $\beta$ -thujaplicinol is not able to act on the DP site; however, in all the retroviral RTs crystallized so far, the geometrical characteristics of the two sites are quite different, and this hypothesis is not very likely to be accurate. It is more plausible that the binding of RDS1643 and DHQ at the PFV RNase H active site may reduce the PFV PR-RT flexibility

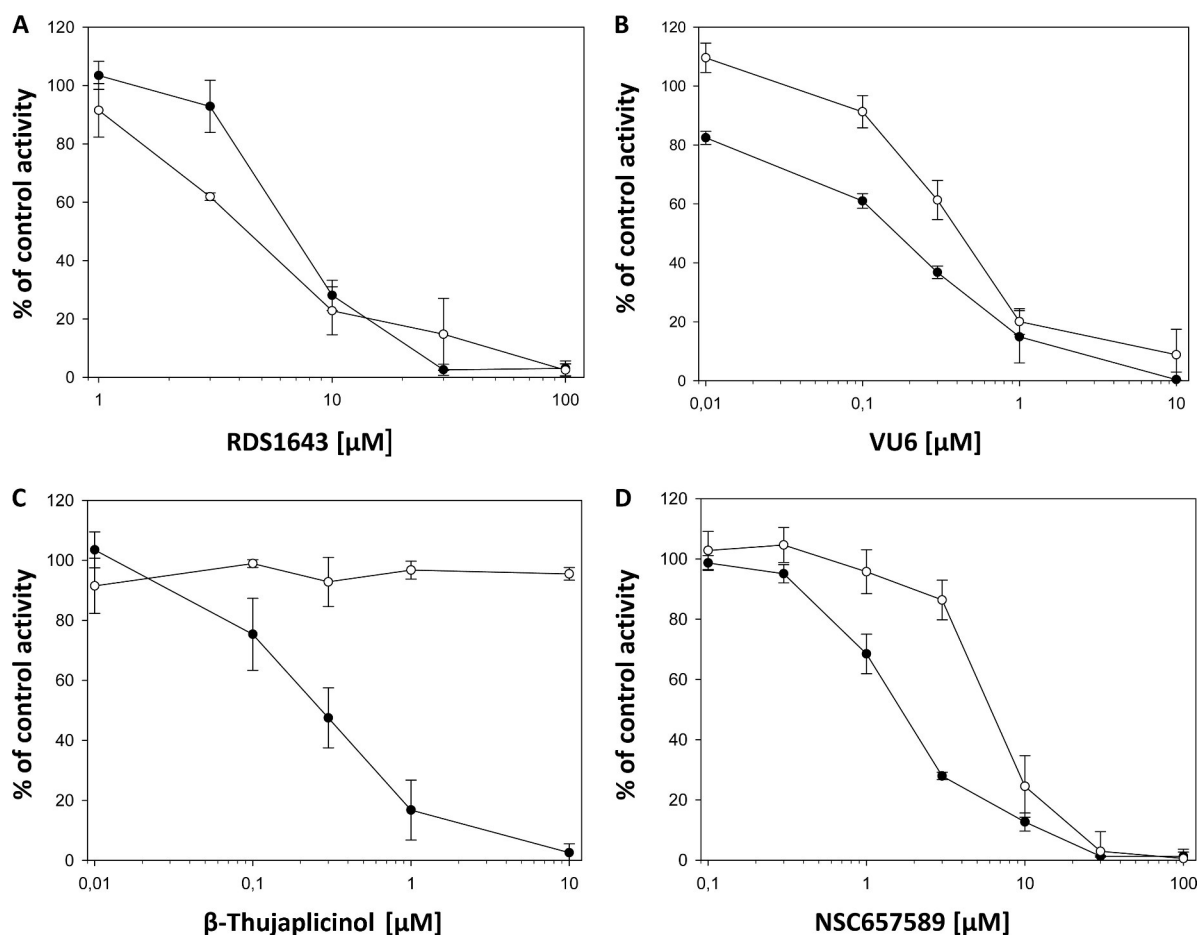


FIG 2 Dose-dependent PFV PR-RT inhibition by HIV-1 RHIs. PFV PR-RT-associated RNase H (filled circles) and RDDP (open circles) activities were assayed at 37°C as described for 1 h (RNase H) and 30 min (RDDP), in the absence and in the presence of different concentrations of RDS1643 (A), VU6 (B),  $\beta$ -thujaplicinol (C), and NSC657589 (D). The results represent the average and standard deviation values of three independent experiments.

and, with a long-range effect, it may also affect its RDDP activity. Moreover, RDS1643 probably contacts the nucleic acid in the RNase H active site and thus might hamper polymerization activity due to a change of primer position in the polymerase active site. Possibly, given the structure of  $\beta$ -thujaplicinol, its binding to the PFV RNase H site does not involve the amino acid residues interacting with RDS1643 and DHQ, so that a long-range effect cannot take place.

Next, we assayed the vinylogous urea derivative VU6, showing that it inhibited the PFV PR-RT-associated RNase H function 2.9-fold-more potently than did HIV-1 RT. Interestingly, VU6 was also able to inhibit PFV PR-RT-associated RDDP activity, while it was inactive on the HIV-1 RT RDDP (Table 1). Of note, the inhibition of PFV RDDP and RNase H activities occurs at comparable compound concentrations (Table 1), suggesting a unique inhibitor binding site exerting an effect on both activities. Since vinylogous urea derivatives have been proposed to bind to a pocket located at the junction between the p51 subunit thumb subdomain and the p66 RNase H domain of HIV-1 RT and, in particular, to interact with an  $\alpha$ -helix adjacent to the RNase H domain in the p51 subunit (32, 37), we speculate that even though HIV-1 RT is a heterodimer and PFV PR-RT is a monomer, this pocket is present in both proteins. Therefore, VU6 inhibition of both PFV PR-RT RNase H and RDDP functions reinforces the hypothesis that the binding of RHIs to PFV PR-RT may decrease its flexibility, leading to a complete loss of its catalytic activities.

Subsequently, we tested the hydrazonoindolin-2-one derivative NSC657589, which has been reported to inhibit both HIV-1 RT-associated functions (33). Our data reveal that it inhibited both PFV PR-RT RNase H and RDDP functions. The  $IC_{50}$ s observed for PFV PR-RT inhibition by NSC657589 were 2- to 3-fold lower than those observed for HIV-1 RT inhibition. NSC657589 has been proposed to inhibit HIV-1 RT by binding a site close to but distinct from the NNRTI binding pocket (33). Therefore, our results suggest that either this pocket is present also in PFV PR-RT or that the NSC657589 activity on HIV-1 RT is due to the binding to a different site, possibly close to the RNase H binding pocket.

In addition, we wanted to test the NNRTI efavirenz on PFV PR-RT functions, since it is known that the NNRTI binding pocket is present in HIV-1 RT only and not in the highly homologous HIV-2 RT (38). In HIV-1 RT, two tyrosines, Y181 and Y188, close to the (underlined) active-site motif Y<sup>183</sup>MDD (VIY<sup>181</sup>QYMD<sup>188</sup>DLY<sup>188</sup>V), as well as the substitution K103N, are involved in efavirenz resistance (38). Sequence comparisons show that in PFV RT, only the tyrosine corresponding to Y188 is present (NVQVYVDDIY<sup>317</sup>L); however, due to the low sequence identity (ca. 26%), it is difficult to judge whether the lysine corresponding to K103 is also present in PFV RT. Our results showed that efavirenz was not able to inhibit either PFV PR-RT function (Table 1), confirming that the NNRTI binding pocket is not present in PFV PR-RT and that the hydrazonoindolin-2-one derivative NSC657589 binds to a different site from that of the NNRTI binding pocket.

**NMR titration experiments with the free PFV RNase H domain.** To learn more about RNase H inhibitor binding, we tested the binding of several of the inhibitors, namely, RDS1643, NSC657589, and VU6, to the free PFV RNase H domain in NMR titration experiments. An NMR spectrum correlating the resonance frequencies of chemical shifts of amide protons directly bonded to <sup>15</sup>N-labeled nitrogen atoms (2D [<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N] heteronu-

clear single quantum correlation [HSQC]) allows the individual detection of peptide backbone signals. Each signal in the spectrum represents a single amino acid of the peptide chain and can be assigned to an individual residue. Changes in the chemical environment of a magnetically active atom, e.g., binding of an inhibitor or ligand, led to changes in the chemical shifts of the signal. Thus, HSQC spectra can be used to investigate inhibitor binding.

We previously solved the structure of PFV RNase H by NMR spectroscopy (PDB ID 2LSN) (7, 8). Thus, NMR assignment and structural information can be used for inhibitor titration experiments. However, measurements using the RNase H inhibitors and PFV RNase H were partially hampered by the low solubility of the inhibitors in aqueous solutions and the high inhibitor concentrations needed in NMR spectroscopy, since concentrations of <sup>15</sup>N-labeled enzyme of around 50 to 100  $\mu$ M are necessary to obtain analyzable signals. In fact, the addition of NSC657589 and VU6 to <sup>15</sup>N-labeled PFV RNase H resulted in partial precipitation of the inhibitors. Final concentrations of about 2 mM NSC657589 (ca. 32-fold excess) or 12 mM VU6 (ca. 194-fold excess) were added to <sup>15</sup>N-labeled PFV RNase H. However, due to the partial precipitation of inhibitors and possibly enzymes even at lower inhibitor concentrations during the measurements, the spectra could not be evaluated (data not shown).

In contrast, the addition of the inhibitor RDS1643 (49-fold excess) gave rise to relevant chemical shift changes of certain residues in the HSQC spectrum (Fig. 3; see also Fig. S1 in the supplemental material). A chemical shift change of  $\geq 0.02$  ppm was considered relevant (Fig. 3A). Significant chemical shift changes upon the addition of inhibitors were observed with residues T598, A614, G617, T641, I647, A648, T668, Y672, A674, W703, K722, H732, and T733. The overlays of the HSQC spectra of residues T641 and W703 recorded at various inhibitor concentrations are illustrated in Fig. 3B. The data confirm that RDS1643 binds to the RNase H domain and suggest that the effects on polymerization are indirect. However, we cannot exclude a second binding site in the polymerase domain.

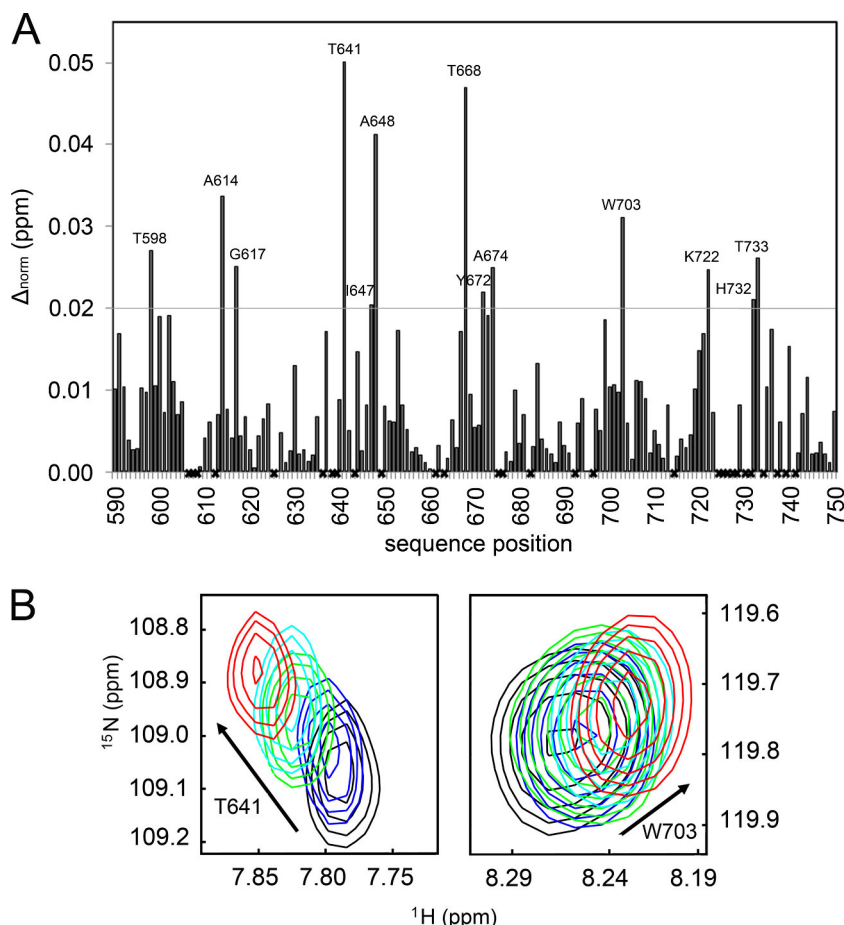
The residues exhibiting significant chemical shift changes upon the addition of inhibitors are highlighted in the three-dimensional structure of PFV RNase H (Fig. 4A). Among the residues leading to significant chemical shift changes, T598, A614, G617, A648, T668, and A674 are not surface exposed, while residues, T641, I647, Y672, and W703 are spatially close together and oriented toward the protein surface (Fig. 4B).

Residues T598, I647, A648, and T668 are adjacent to the active-site residues D599, E646, and D669, respectively (Fig. 4A). W703 is in the  $\alpha$ -helix D, which follows the basic loop that has been shown to be involved in nucleic acid substrate binding (8). T641 is located at the beginning of the  $\alpha$ -helix A, which also harbors the active-site residue E646.

These data indicate that the inhibitor binding pocket is located next to the active site and might be formed by the surface-exposed residues T641, I647, Y672, and W703. The residues K722, H732, and T733 located at the beginning of the  $\alpha$ -helix E and the adjacent N-terminal loop are also surface exposed. However, they exhibited only small chemical shift changes ( $< 0.03$  ppm), which might be due to minor direct or indirect conformational changes induced by the binding of the inhibitor.

Most of the other residues shown in Fig. 4A are located in the interior of the protein (Fig. 4B) and therefore do not come into consideration for direct inhibitor contact. Rather, the binding of





**FIG 3** Backbone chemical shift changes upon inhibitor binding. (A) Changes of chemical shifts of PFV RNase H after adding 3.9 mM RDS1643 as a function of the primary sequence. Normalized chemical shift changes of  $>0.02$  ppm, indicated by a horizontal gray line, were considered significant. Residues that were not assigned are marked by an x. (B)  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQC overlays of the T641 (left panel) and W703 (right panel) amide cross peaks at each inhibitor titration step shown in different colors (black, 0 mM; blue, 1.0 mM; green, 2.0 mM; cyan, 3.0 mM; red, 3.9 mM).

the inhibitor can lead to indirect changes in the local structure of the protein by changing side-chain orientations.

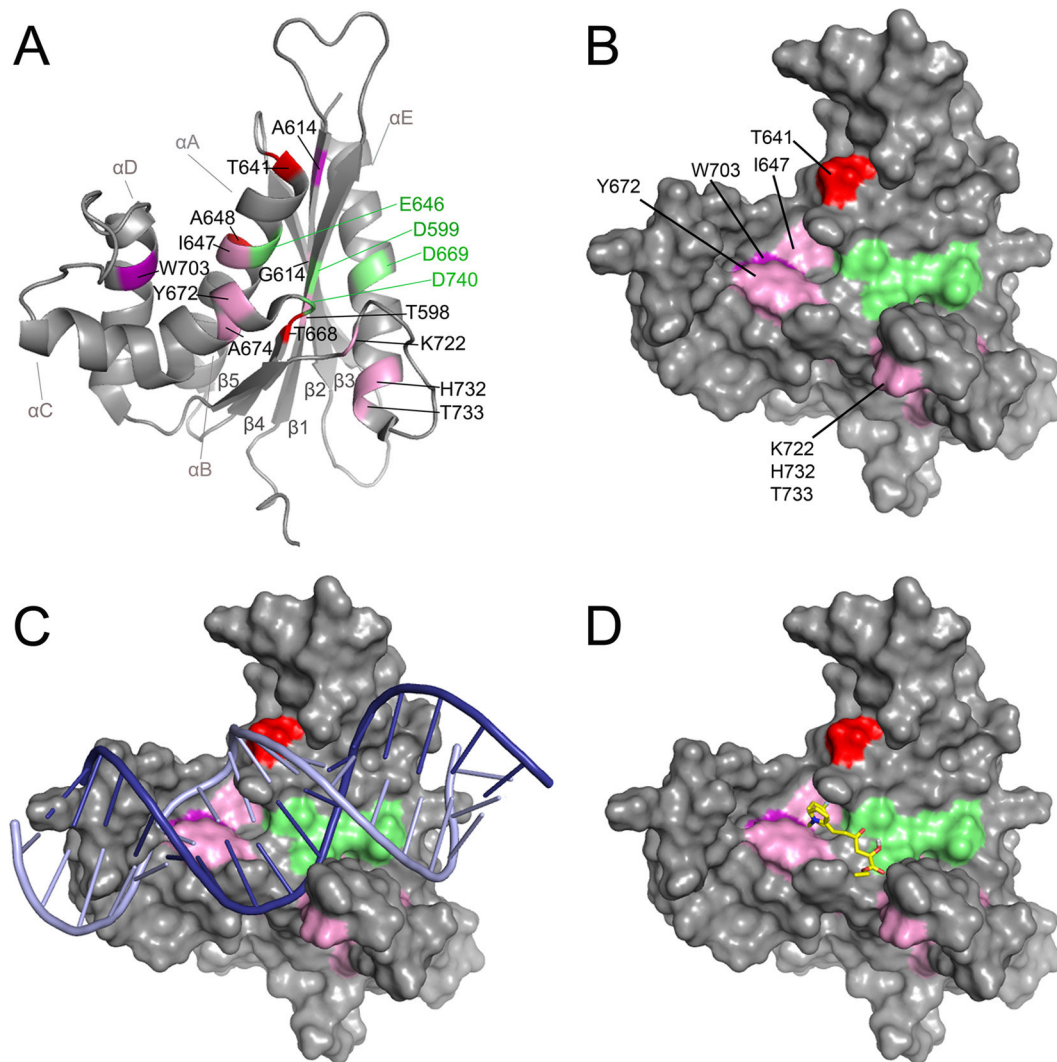
To show how the nucleic acid substrate is bound in relation to the putative inhibitor binding pocket, we modeled the RNA/DNA substrate of the human RNase H-RNA-DNA complex (PDB ID 2QK9) onto the PFV RNase H (8). For clarity, only the nucleic acid without the human RNase H is presented (Fig. 4C). It has been shown by UV/visible light (Vis) spectroscopy and isothermal titration calorimetry that RDS1643 and other diketo acids (DKAs) bind  $\text{Mg}^{2+}$  or  $\text{Mn}^{2+}$  (26, 28) and thus can interact with the metal ions in the active site of the RNase H. This is consistent with our observation of chemical shift changes in the NMR titration experiment close or next to the active-site residues. Overall, these data suggest that RDS1643 can bind  $\text{Mg}^{2+}$  in the RNase H active site and that it can make additional interactions with residues next to it to stabilize its binding.

To further verify this mode of interaction, we performed docking calculations with RDS1643 and PFV RNase H using the program AutoDock Vina (29). Based on our NMR data, we limited the potential binding site to the active site and the area that includes residues T641, I647, Y672, and W703. Figure 4D depicts a possible binding mode of the inhibitor that is in good agreement with our results. The keto groups of RDS1643 reach into the RNase H active

site and thus may be able to bind the metal ions, while the hydrophobic part of the molecule is close to Y672 and W703.

**Structure comparisons.** To elucidate the binding of RDS1643 to HIV-1 RNase H, we performed a secondary structural alignment of HIV-1 RNase H and PFV RNase H (Fig. 5A). In HIV-1 RNase H, residues T473, L479, Y501, and V518 correspond to T641, I647, Y672, and W703 in the inhibitor binding pocket of PFV RNase H. The structural overlay of PFV RNase H with HIV-1 RNase H presented in Fig. 5B implies that in HIV-1 RNase H, the binding of the inhibitor might take place in a similar way. Nevertheless, RDS1643 binding to the RNase H might have different effects on the RDDP activities of the two enzymes, owing to structural differences, i.e., being a heterodimer versus a monomer. Therefore, specific studies on HIV-1 RT are needed to elucidate the RDS1643 mode of RNase H inhibition.

Despite the utility of PFV RNase H as a model system, we did not attempt to select for resistant virus, since the replication cycles between the two viruses and the time point of reverse transcription in those cycles differ, i.e., while reverse transcription in HIV-1 takes place immediately after the virus enters the cell, reverse transcription in FVs occurs predominantly in the virus-producing cell before the virus leaves the infected cell. Thus, FVs harbor DNA in the virus particle (39–41). These differences might have an impact



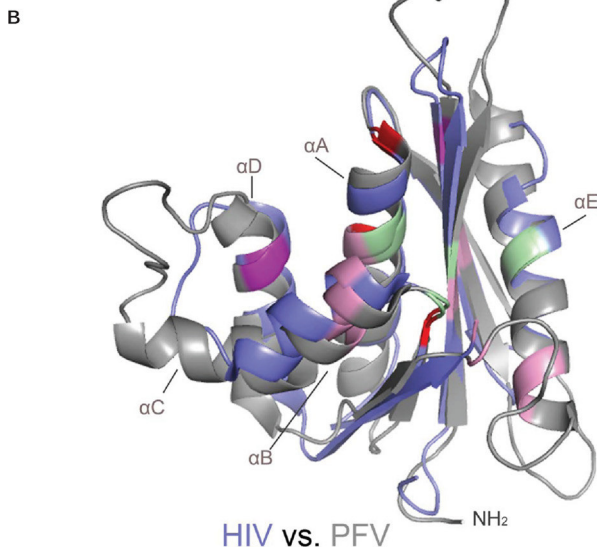
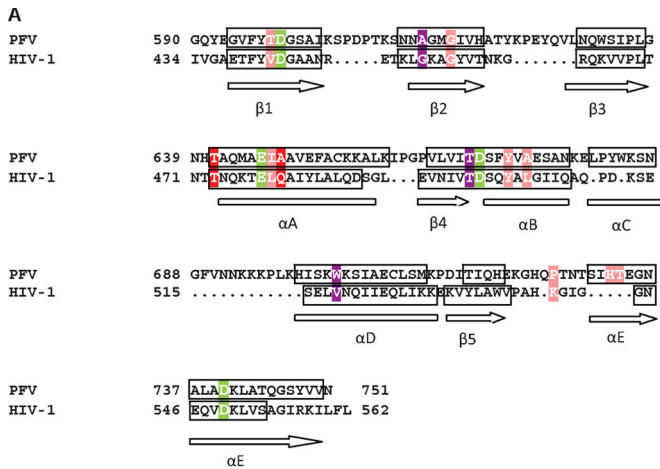
**FIG 4** Identification of the putative inhibitor binding site on the structure of PFV RNase H. The normalized chemical shift changes (weighted geometric average of  $^1\text{H}^{\text{N}}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift changes) are shown in the PFV RNase H. Amino acids showing significant chemical shift changes at an RDS1643 concentration of 3.9 mM are highlighted. Changes of  $\geq 0.02$  ppm are illustrated in pink, changes of  $> 0.03$  ppm are shown in violet, and changes of  $> 0.04$  ppm are shown in red. The active-site residues are represented in green. (A) Ribbon presentation of PFV RNase H (PDB ID 2LSN). (B) Surface presentation of PFV RNase H highlighting the surface-exposed residues with significant chemical shift changes. (C) Surface presentation of PFV RNase H with an RNA/DNA hybrid. Based on the structure of the human RNase H-substrate complex (PDB ID 2QK9), a structural alignment of the PFV and human RNase H was performed to model the RNA/DNA substrate of the human RNase H onto PFV RNase H (root mean square deviation [RMSD], 2.35 Å) (8). The RNA strand is shown in dark blue and the DNA strand in light blue. (D) Inhibitor modeling. RDS1643 was modeled onto the structure of the PFV RNase H using the modeling program AutoDock Vina (29).

on the development of resistant viruses and might make results difficult to compare and interpret.

**Conclusions.** We tested the effect of five HIV-1 RHIs known to interact with different HIV-1 RT pockets on PFV RT *in vitro*: four selective RHIs (RDS1643, DHQ,  $\beta$ -thujaplicinol, and VU6) and one HIV-1 RDDP and RNase H dual inhibitor (NSC657589). Moreover, for comparative purposes, we included in the study the nonnucleoside inhibitor efavirenz. All RHIs inhibited the PFV RNase H function at low-micromolar or nanomolar concentrations. These results are comparable to the ones reported for HIV-1 RNase H, indicating similar binding in the two proteins (Table 1). Among the selective RHIs tested, RDS1643, DHQ, and VU6 inhibited the FV RT-associated RDDP activity, suggesting differences with HIV-1 RT in the structure and flexibility of the protein.

NSC657589 was confirmed in its ability to inhibit both functions in PFV RT. Efavirenz was inactive on PFV PR-RT, indicating the lack of the nonnucleoside binding pocket, as reported for other monomeric RTs, confirming that NSC657589 does not bind to the nonnucleoside binding pocket.

Since the structure of PFV RNase H has been determined by NMR spectroscopy (7, 8), NMR analysis was used to characterize the interactions of RDS1643 with the protein. In the presence of magnesium ions, NMR titration experiments revealed several conformational changes of the residues next to the active-site amino acids, indicating an interaction between the keto groups of RDS1643 and the magnesium ions in the RNase H active site. Moreover, chemical shifts of noncatalytic residues in the PFV RNase H active-site region (T641, I647, Y672, and W703) might



**FIG 5** Identification of the putative inhibitor binding pocket in HIV-1 RNase H. (A) Sequence and secondary structure alignment of PFV and HIV-1 RNase H to identify the corresponding residues HIV-1 RNase H (PDB ID 1HRH). The active-site residues are highlighted in green. The four residues in HIV-1 RNase H that are equivalent to the ones in PFV RNase H exhibiting chemical shift changes at 3.9 mM RDS1643 are labeled according to the color coding described for Fig. 4A. (B) Structural overlay of the RNases H from PFV (PDB ID 2LSN) (gray) and HIV-1 (PDB ID 1HRH). (blue). Color coding of relevant residues is as described in Fig. 5A.

provide a hydrophobic pocket for the aromatic moiety of RDS1643 and thus improve its binding affinity. Due to the high structural similarity of PFV and HIV-1 RNase H, docking experiments and structural overlays enabled us to propose an inhibitor binding site in HIV-1 RNase H. This includes the corresponding HIV-1 RNase H residues T473, L479, Y501, and V518, some of which are conserved, since they are located in the RNase H primer grip area. Our results suggest that PFV RNase H can be used as a model enzyme to analyze the binding of HIV-1 RHIs, while it cannot be used to analyze HIV-1 NNRTI binding.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by RAS grant LR 7/2007 CRP-24915, the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant Wo630/7-3), and the University of Bayreuth, Germany.

We thank Ramona Heissmann for purifying the PFV PR-RT and PFV RNase H.

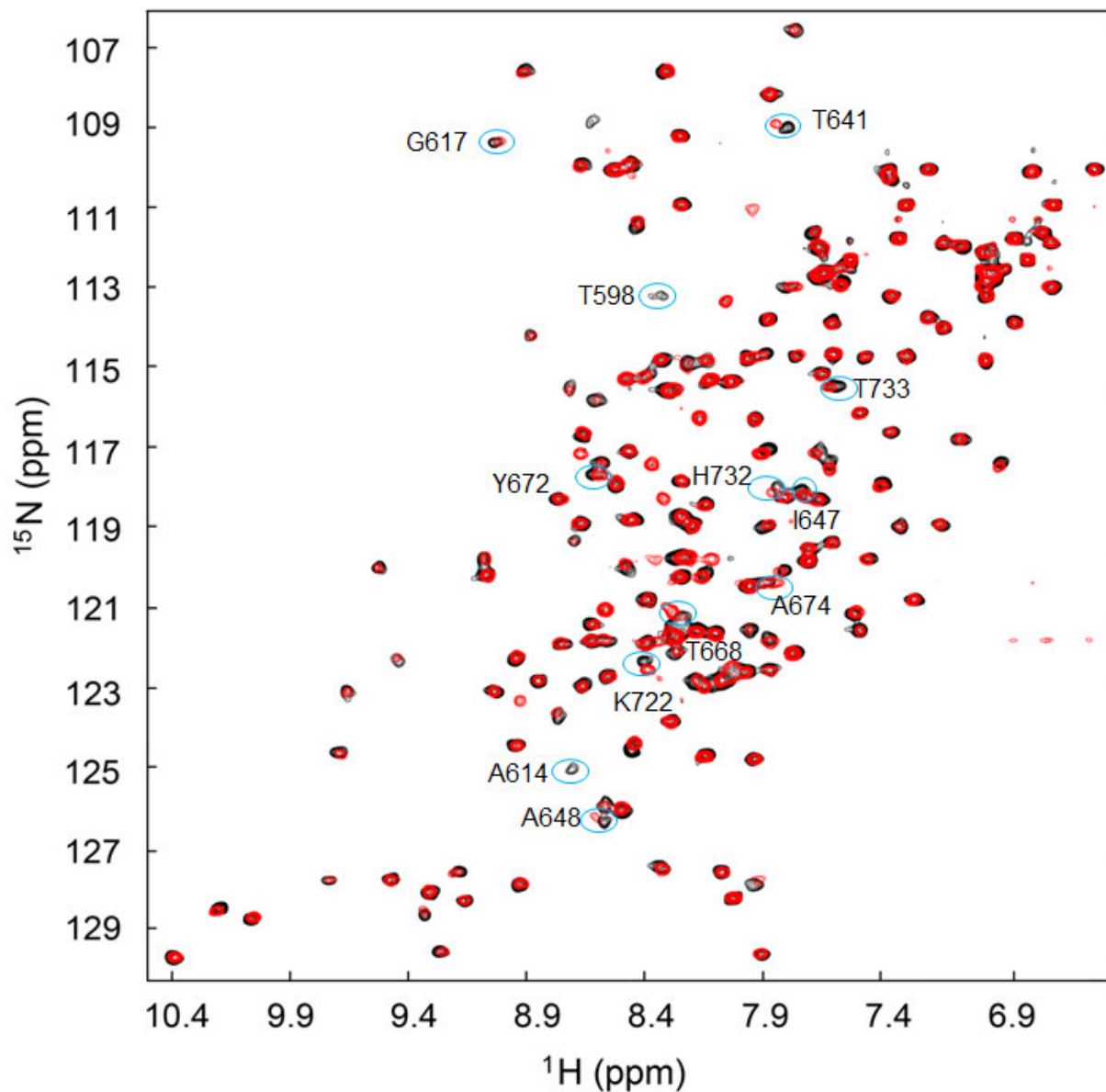
#### REFERENCES

- Rinke CS, Boyer PL, Sullivan MD, Hughes SH, Linial ML. 2002. Mutation of the catalytic domain of the foamy virus reverse transcriptase leads to loss of processivity and infectivity. *J. Virol.* 76:7560–7570. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.15.7560-7570.2002>.
- Boyer PL, Stenbak CR, Clark PK, Linial ML, Hughes SH. 2004. Characterization of the polymerase and RNase H activities of human foamy virus reverse transcriptase. *J. Virol.* 78:6112–6121. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.12.6112-6121.2004>.
- Hartl MJ, Mayr F, Rethwilm A, Wöhrl BM. 2010. Biophysical and enzymatic properties of the simian and prototype foamy virus reverse transcriptases. *Retrovirology* 7:5. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-7-5>.
- Hartl MJ, Wöhrl BM, Rösch P, Schweimer K. 2008. The solution structure of the simian foamy virus protease reveals a monomeric protein. *J. Mol. Biol.* 381:141–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.064>.
- Hartl MJ, Bodem J, Jochheim F, Rethwilm A, Rösch P, Wöhrl BM. 2011. Regulation of foamy virus protease activity by viral RNA: a novel and unique mechanism among retroviruses. *J. Virol.* 85:4462–4469. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02211-10>.
- Goff SP. 2007. *Retroviridae: The retroviruses and their replication*, p 1999–2069. In Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Leo B, Hartl MJ, Schweimer K, Mayr F, Wöhrl BM. 2012. Insights into the structure and activity of prototype foamy virus RNase H. *Retrovirology* 9:14. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-9-14>.
- Leo B, Schweimer K, Rösch P, Hartl MJ, Wöhrl BM. 2012. The solution structure of the prototype foamy virus RNase H domain indicates an important role of the basic loop in substrate binding. *Retrovirology* 9:73. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-9-73>.
- Evans DB, Brawn K, Deibel MR, Jr, Tarpley WG, Sharma SK. 1991. A recombinant ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase that is enzymatically active. *J. Biol. Chem.* 266:20583–20585.
- Hostomsky Z, Hostomska Z, Hudson GO, Moomaw EW, Nodes BR. 1991. Reconstitution *in vitro* of RNase H activity by using purified N-terminal and C-terminal domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:1148–1152. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.4.1148>.
- Smith JS, Gritsman K, Roth MJ. 1994. Contributions of DNA polymerase subdomains to the RNase H activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Virol.* 68:5721–5729.
- Esposito F, Corona A, Tramontano E. 2012. HIV-1 reverse transcriptase still remains a new drug target: structure, function, classical inhibitors, and new inhibitors with innovative mechanisms of actions. *Mol. Biol. Int.* 2012:586401. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/586401>.
- Tramontano E. 2006. HIV-1 RNase H: recent progress in an exciting, yet little explored, drug target. *Mini Rev. Med. Chem.* 6:727–737. <http://dx.doi.org/10.2174/138955706777435733>.
- Tramontano E, Di Santo R. 2010. HIV-1 RT-associated RNase H function inhibitors: recent advances in drug development. *Curr. Med. Chem.* 17:2837–2853. <http://dx.doi.org/10.2174/092986710792065045>.
- Distinto S, Maccioni E, Meleddu R, Corona A, Alcaro S, Tramontano E. 2013. Molecular aspects of the RT/drug interactions. Perspective of dual inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 19:1850–1859. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612811319100009>.
- Rausch JW. 2013. Ribonuclease inhibitors: structural and molecular biology, p 143–172. In Le Grice SFJ, Gotte M (ed), *Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. A bench-to-bedside success*. Springer, London, United Kingdom.
- Himmel DM, Maegley KA, Pauly TA, Bauman JD, Das K, Dharia C, Clark AD, Jr, Ryan K, Hickey MJ, Love RA, Hughes SH, Bergqvist S, Arnold E. 2009. Structure of HIV-1 reverse transcriptase with the inhibitor beta-thujaplicinol bound at the RNase H active site. *Structure* 17:1625–1635. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2009.09.016>.
- Himmel DM, Sarafianos SG, Dharmasena S, Hossain MM, McCoy-Simandle K, Iliina T, Clark AD, Jr, Knight JL, Julias JG, Clark PK, Krogh-Jespersen K, Levy RM, Hughes SH, Parniak MA, Arnold E. 2006. HIV-1 reverse transcriptase structure with RNase H inhibitor dihydroxy benzoyl naphthyl hydrazine bound at a novel site. *ACS Chem. Biol.* 1:702–712. <http://dx.doi.org/10.1021/cb600303y>.

19. Kirschberg TA, Balakrishnan M, Squires NH, Barnes T, Brendza KM, Chen X, Eisenberg EJ, Jin W, Kutty N, Leavitt S, Liclican A, Liu Q, Liu X, Mak J, Perry JK, Wang M, Watkins WJ, Lansdon EB. 2009. RNase H active site inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: design, biochemical activity, and structural information. *J. Med. Chem.* 52:5781–5784. <http://dx.doi.org/10.1021/jm900597q>.
20. Lansdon EB, Liu Q, Leavitt SA, Balakrishnan M, Perry JK, Lancaster-Moyer C, Kutty N, Liu X, Squires NH, Watkins WJ, Kirschberg TA. 2011. Structural and binding analysis of pyrimidinol carboxylic acid and *N*-hydroxy quinazolinone HIV-1 RNase H inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2905–2915. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01594-10>.
21. Su HP, Yan Y, Prasad GS, Smith RF, Daniels CL, Abeywickrema PD, Reid JC, Loughran HM, Kornienko M, Sharma S, Grobler JA, Xu B, Sardana V, Allison TJ, Williams PD, Darke PL, Hazuda DJ, Munshi S. 2010. Structural basis for the inhibition of RNase H activity of HIV-1 reverse transcriptase by RNase H active site-directed inhibitors. *J. Virol.* 84:7625–7633. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00353-10>.
22. Pari K, Mueller GA, DeRose EF, Kirby TW, London RE. 2003. Solution structure of the RNase H domain of the HIV-1 reverse transcriptase in the presence of magnesium. *Biochemistry* 42:639–650. <http://dx.doi.org/10.1021/bi0204894>.
23. Christen MT, Menon L, Myshakina NS, Ahn J, Parniak MA, Ishima R. 2012. Structural basis of the allosteric inhibitor interaction on the HIV-1 reverse transcriptase RNase H domain. *Chem. Biol. Drug Des.* 80:706–716. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12010>.
24. Gong Q, Menon L, Ilina T, Miller LG, Ahn J, Parniak MA, Ishima R. 2011. Interaction of HIV-1 reverse transcriptase ribonuclease H with an acylhydrazone inhibitor. *Chem. Biol. Drug Des.* 77:39–47. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0285.2010.01052.x>.
25. Stahl SJ, Kaufman JD, Vikić-Topić S, Crouch RJ, Wingfield PT. 1994. Construction of an enzymatically active ribonuclease H domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Protein Eng.* 7:1103–1108. <http://dx.doi.org/10.1093/protein/7.9.1103>.
26. Shaw-Reid CA, Munshi V, Graham P, Wolfe A, Witmer M, Danzeisen R, Olsen DB, Carroll SS, Embrey M, Wai JS, Miller MD, Cole JL, Hazuda DJ. 2003. Inhibition of HIV-1 ribonuclease H by a novel diketo acid, 4-[5-(benzoylamino)thien-2-yl]-2,4-dioxobutanoic acid. *J. Biol. Chem.* 278:2777–2780. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C200621200>.
27. Davies JF, Jr, Hostomska Z, Hostomsky Z, Jordan SR, Matthews DA. 1991. Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 252:88–95. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1707186>.
28. Tramontano E, Esposito F, Badas R, Di Santo R, Costi R, La Colla P. 2005. 6-[1-(4-Fluorophenyl)methyl-1H-pyrrol-2-yl]-2,4-dioxo-5-hexenoic acid ethyl ester a novel diketo acid derivative which selectively inhibits the HIV-1 viral replication in cell culture and the ribonuclease H activity *in vitro*. *Antiviral Res.* 65:117–124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.11.002>.
29. Trott O, Olson AJ. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31:455–461.
30. Suchaud V, Bailly F, Lion C, Tramontano E, Esposito F, Corona A, Christ F, Debyser Z, Cotellet P. 2012. Development of a series of 3-hydroxyquinolin-2(1H)-ones as selective inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase associated RNase H activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22:3988–3992. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.096>; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.096>.
31. Chung S, Himmel DM, Jiang JK, Wojtak K, Bauman JD, Rausch JW, Wilson JA, Beutler JA, Thomas CJ, Arnold E, Le Grice SF. 2011. Synthesis, activity, and structural analysis of novel  $\alpha$ -hydroxytropolone inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated ribonuclease H. *J. Med. Chem.* 54:4462–4473. <http://dx.doi.org/10.1021/jm2000757>.
32. Chung S, Wendeler M, Rausch JW, Beilhartz G, Gotte M, O'Keefe BR, Bermingham A, Beutler JA, Liu S, Zhuang X, Le Grice SF. 2010. Structure-activity analysis of vinylogous urea inhibitors of human immunodeficiency virus-encoded ribonuclease H. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:3913–3921. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00434-10>.
33. Distinto S, Esposito F, Kirchmair J, Cardia MC, Gaspari M, Maccioni E, Alcaro S, Markt P, Wolber G, Zinzula L, Tramontano E. 2012. Identification of HIV-1 reverse transcriptase dual inhibitors by a combined shape-, 2D-fingerprint- and pharmacophore-based virtual screening approach. *Eur. J. Med. Chem.* 50:216–229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.01.056>.
34. Esposito F, Sanna C, Del Vecchio C, Cannas V, Venditti A, Corona A, Bianco A, Serrilli AM, Guarcini L, Parolin C, Ballero M, Tramontano E. 2013. *Hypericum hircinum* L. components as new single-molecule inhibitors of both HIV-1 reverse transcriptase-associated DNA polymerase and ribonuclease H activities. *Pathog. Dis.* 68:116–124. <http://dx.doi.org/10.1111/2049-632X.12051>.
35. Esposito F, Corona A, Zinzula L, Kharlamova T, Tramontano E. 2012. New anthraquinone derivatives as inhibitors of the HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H function. *Chemotherapy* 58:299–307. <http://dx.doi.org/10.1159/000343101>.
36. Esposito F, Kharlamova T, Distinto S, Zinzula L, Cheng YC, Dutschman G, Floris G, Markt P, Corona A, Tramontano E. 2011. Alizarine derivatives as new dual inhibitors of the HIV-1 reverse transcriptase-associated DNA polymerase and RNase H activities effective also on the RNase H activity of non-nucleoside resistant reverse transcriptases. *FEBS J.* 278:1444–1457. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08057.x>.
37. Chung S, Miller JT, Johnson BC, Hughes SH, Le Grice SF. 2012. Mutagenesis of human immunodeficiency virus reverse transcriptase p51 subunit defines residues contributing to vinylogous urea inhibition of ribonuclease H activity. *J. Biol. Chem.* 287:4066–4075. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.314781>.
38. Ren J, Stammers DK. 2008. Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Virus Res.* 134:157–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2007.12.018>.
39. Yu SF, Baldwin DN, Gwynn SR, Yendapalli S, Linial ML. 1996. Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* 271:1579–1582. <http://dx.doi.org/10.1126/science.271.5255.1579>.
40. Yu SF, Sullivan MD, Linial ML. 1999. Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J. Virol.* 73:1565–1572.
41. Rethwilm A. 2010. Molecular biology of foamy viruses. *Med. Microbiol. Immunol.* 199:197–207. <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-010-0158-x>.

## Supplementary Information

Figure S1



**Figure S1: Interaction of PFV RNase H with inhibitor RDS1643.** (A) Overlay of [ $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$ ] HSQC spectra of 80  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$  labeled PFV RNase H in the absence (black) and presence of 3.9 mM RDS1643 (red). Resonances with significant changes of chemical shifts are labeled.



## 11 Danksagung

Prof. Dr. Birgitta M. Wöhrl möchte ich für das interessante und vielseitige Projekt sowie die ausgezeichnete Betreuung herzlich danken. Besonders für ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge sowie ihre fachliche und menschliche Unterstützung möchte ich Ihr Dank aussprechen. Danke für Deine konstruktive Kritik, dein Verständnis und deine Geduld.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Paul Rösch, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit am Lehrstuhl Biopolymere unter ausgezeichneten Arbeitsbedingungen durchzuführen.

Ebenso danke ich der BIGSS-Graduiertenschule sowie der Stabsabteilung für Chancengleichheit für die finanziellen Förderungsmaßnahmen, welche mir sehr geholfen haben meine Dissertation fertigzustellen.

Außerdem möchte ich Dr. Kristian Schweimer für seine Erläuterungen und Hilfestellungen bei den NMR-Experimenten vielmals danken.

Berit Leo danke ich für all die freundschaftlichen Gespräche und für ihre hilfreichen Denkanstöße. Auch meinen Kolleginnen/en Johanna Drögemüller, Martin Strauß, Christian Seutter von Loetzen, Dr. Stefan Knauer und Dr. Maximilian Hartl möchte ich für ein sehr angenehmes und produktives Arbeitsklima danken. Danke auch für eure Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch Ramona Heißmann für ihre Unterstützung bei jeglicher Art von Problemen im Laboralltag aussprechen. Ulrike Persau danke ich für die Hilfe bei Klonierungen und all die freundlichen, aufmunternden Worte.

Danke auch an Andrea Hager für Ihre Hilfe bei Bestellungen und Rainer Hofmann für das Lösen von Computerproblemen. Unserer Sekretärin Anja Groh danke ich für ihr Engagement bei organisatorischen Problemen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, die mich über die ganzen Jahre hinweg in jeglicher Hinsicht unterstützt und ermutigt haben Dank aussprechen. Danke, dass ihr stets für mich da seid.

Meinem lieben Freund Sven danke ich für das Interesse an meiner Arbeit sowie die manchmal nötige Ablenkung davon.





## 12 (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 8 S. 2 Nr. 6 PromO)

*Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.*

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

*Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.*

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

*Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.*

(§ 8 S. 2 Nr. 10 PromO)

*Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. –vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.*

---

Ort, Datum, Unterschrift

