

Diss. ETH Nr. 10147

**STRUCTURE-FUNCTION STUDIES ON THE HUMAN
IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 REVERSE
TRANSCRIPTASE**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

MICHAEL ROSTAM BAVAND

Master of Science, Weizmann Institute of Science

born 6th November 1957,

from Germany

accepted on the recommendation of

Prof.T.J.Richmond, examiner

Prof.H.Zuber, coexaminer

Zurich, 1993

Structure-function studies on reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the etiological agent of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). A primary target for inhibition of HIV-1 is the virus-encoded reverse transcriptase (RT), a key enzyme in its replication cycle, and this has hastened studies towards its full biochemical and biophysical characterization.

In order to study this enzyme, RT and mutants were overexpressed in *Escherichia coli* and purified to near homogeneity. Conditions for the crystallization of the heterodimeric (p66/51) form of RT have been defined, although these are not yet suitable for crystallographic studies. Human tRNA^{Lys3}, the specific primer for RT to initiate reverse transcription has been produced and purified both *in vitro* and in *Escherichia coli* and has been used to study RT-tRNA interactions.

RT has both ribonuclease H (RNase H) and polymerase functions encoded by the same primary sequence and the enzyme is active as a dimer. In order to study the influence of the RNaseH domain of RT on subunit structure and polymerase activity, an engineered homodimeric (p51) form of the enzyme which lacks the ribonuclease H subdomain was compared to the heterodimeric form found in virions. Activity gel analysis (which probes the competence of subunits for catalysis), steady-state kinetics (which probes the overall catalytic competence of enzymes), and processivity measurements indicated that the RNase H domain was not required for polymerase function, and that the two p51 molecules may form a functional polymerase molecule irrespective of their previous engagement in p51 homodimers or p66/51 heterodimers. Although not essential for polymerase function, the RNase H domain enhances the formation of a Michaelis complex. It also facilitates the transition from a non-processive mode of polymerization observed at early reaction times to a processive mode of synthesis at later reaction times and thus, has an influence on the dynamics of the polymerization process.

A novel type of assay for studying the topography of nucleic acid-protein interactions was developed and used for the comparison of subunit structures of p51 homodimer and p66/51 heterodimer RT. For this, reversible tRNA crosslinking in conjunction with RNase footprinting showed that the tRNA interacts with both subunits, and also showed the structural similarity of both catalytic and noncatalytic subunits of RT p51 homo and p66/51 heterodimers. From the sequence of the protected fragments it was deduced that both RT variants interact with tRNA^{Lys3} along the inside of the L-shaped tRNA molecule and from the D-loop side, implying that the intact tertiary folding of tRNA is important in the interaction of tRNA^{Lys3} with HIV-1 RT. Combined biochemical and structural data from the heterodimer led to the development of a model in which tRNA interacts with RT by bridging both of its subunits.

Struktur-Funktionsstudien an der reversen Transcriptase von HIV-1

HIV-1 ist die Krankheitsursache für die erworbene Immunschwäche (AIDS). Eines der Hauptziele für eine therapeutische Intervention ist die Virus-kodierte Reverse Transkriptase (RT), die ein Schlüsselenzym im Replikationszyklus dieses Virus ist und deren biochemische und biophysikalische Charakterisierung energisch betrieben wird.

RT und deren Mutanten wurden im Bakterium *Escherichia coli* überexprimiert und hoch aufgereinigt. Das Enzym, wurde als Heterodimer (p66/51) kristallisiert, jedoch diffraktieren diese Kristalle noch nicht genügend um kristallographische Studien durchführen zu können. Die menschliche tRNA^{Lys3}, die als spezifischer Initiationsprimer in der reversen Transkription fungiert, wurde sowohl in *Escherichia coli* als auch *in vitro* exprimiert und aufgereinigt und diente zu Studien über die Wechselwirkung zwischen RT und tRNA. RT, das als dimeres Enzym aktiv ist, hat zwei enzymatische Funktionen, Ribonuklease H (RNase H) und Polymerase, welche auf derselben Polypeptidsequenz kodiert werden. Um den Einfluss der RNase H Domäne auf die Polymerase Funktion studieren zu können, wurde eine p51 homodimäre Mutante hergestellt, der die RNase H Domäne fehlt. Aktivitätsgelanalyse (welches die katalytische Kompetenz der einzelnen Untereinheiten aufzeigt), enzymkinetische Untersuchungen und die Messung des prozessiven Charakters der verschiedenen Formen der RT zeigten auf, dass die RNase H Domäne für eine funktionelle Polymerase nicht benötigt wird und dass zwei p51 Untereinheiten ein Homodimer bilden können, wobei es gleich ist ob die p51 Untereinheiten des neugebildeten funktionellen Homodimers aus einer Enzymform gewonnen wurde bei der die p51 Untereinheit zuvor inaktiv (p66/51) oder aktiv (p51/51) gefaltet war. Obwohl die RNase H Domäne nicht essentiell für die katalytische Funktion der Polymerase ist, übt sie dennoch einen Einfluss aus indem sie die Bildung eines Michaelis Komplexes beschleunigt und bewirkt, dass das Enzym von einer nicht-prozessiven Polymerisationsweise in eine prozessive überwechselt, was zu einem späteren Zeitpunkt der Katalyse beobachtet wurde. Ferner wurde eine Methode entwickelt um die Topographie der statischen Wechselwirkungen zwischen Nucleinsäuren und Proteinen zu studieren. Diese Methode wurde benutzt um die strukturelle Anordnung der Untereinheiten des p51 Homodimers mit der des p66/51 Heterodimers zu vergleichen. Die Methode beruht darauf, tRNA reversibel an das Protein zu vernetzen und mit RNase T₁ zu verdauen und danach die RNA Fragmentmuster zu vergleichen. Diese Studien zeigten dass in beiden Enzymvarianten (Homo- und Heterodimer), jeweils beide Untereinheiten sehr

ähnlich aufgebaut sind. Basierend auf der Sequenzanalyse der isolierten RNA Fragmente und der Vernetzungsexperimente wurde ein Modell erstellt, bei dem die Reverse Transcriptase mit der tRNA an der Innenseite der L-förmigen tRNA Struktur und an der D-Schleife seitlich wechselwirkt und die tRNA beide Untereinheiten des Enzyms überbrückt.