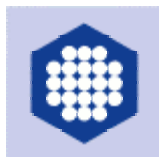




**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA,
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**

a

**ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE AKADEMIE VĚD
ČESKÉ REPUBLIKY**



Bakalárska práca oboru molekulární biologie a biochemie organismů na tému:

Úloha Gag polyproteínov pri zbal'ovaní a pučaní retrovírusov

Vypracoval:

Peter HOBOTH

Školiteľ:

Aleš ZÁBRANSKÝ, PhD.

Súhrn

Zbaľovanie retrovírusov je kľúčovým krokom v ich replikačnom cykle, pri ktorom je množstvo makromolekúl transportovaných rôznymi cestami na miesto tvorby nezrelých vírusových častíc. Podstatu tohto procesu tvoria interakcie medzi vírusovými proteínmi navzájom, medzi vírusovými a bunecnými proteínmi a interakcie s nukleovými kyselinami a lipidmi. Produkt retrovírusového génu *gag*, Gag polyproteínový prekurzor, je základným stavebným blokom pri vytváraní retrovírusových kapsíd. Vo svojej štruktúre nesie informácie potrebné pre vnútrobunecný transport, formovanie kapsíd a odškrcovanie membrány v procese pučania. U retrovírusov boli pozorované dve hlavné morfogenetické dráhy označované ako (i) typ C a (ii) typ B/D. Gag polyproteíny retrovírusov morfogenetického typu C sú smerované priamo na cytoplazmatickú membránu, kde prebieha tvorba vírusových častíc súčasne s ich uvoľňovaním z hostiteľskej bunky. Retrovírusy morfogenetických typov B/D vytvárajú nezrelé častice v cytoplazme a tie sú následne transportované k cytoplazmatickej membráne, aby boli v procese pučania uvoľnené z bunky. Pri pučaní regrutujú retrovírusy svojimi L (z angl. late) doménami bunecné proteíny zúčastňujúce sa triedenia proteínov a formovania váčkov MVB (z angl. multivesicular body) oddielu. Týmto spôsobom retrovírusy uzurpujú endocytotické dráhy hostiteľskej bunky a presmerovávajú ich von z bunky. Bez ohľadu na morfogenetický typ, expresia *gag* génových polyproteínových produktov i v neprítomnosti ostatných vírusových komponent vedie k úspešnému zbaľovaniu a uvoľňovaniu membránou obalených vírusom podobných častíc (z angl. virus-like particles, VLPs) z hostiteľských buniek. Počas alebo ihneď po uvoľnení viriónov z hostiteľskej bunky sú polyproteínové prekurzory tvoriace nezrelú vírusovú časticu proteolyticky štiepené vírusovou proteázou na separátne proteíny. V tomto procese zvanom maturácia dochádza k dramatickému preusporiadaniu vnútornej štruktúry vírusu a vzniku infekčnej vírusovej častice.

Kľúčové slová: retrovírus, Gag polyproteín, zbaľovanie, pučanie, L domény, MVB.

Abstract

Retrovirus assembly, a key step in the viral replication cycle, involves a process in which large numbers of macromolecules are transported through different transport pathways to a point of formation of nascent viral particles. Interactions between viral proteins themselves, between proteins of viral and cell origin, as well as those with nucleic acids and lipids, take place in the assembly process. Retroviral *gag*-gene product, Gag polyprotein, functions as the primary building block in virus capsid assembly. Hence it ensures intracellular transport, directs assembly into the capsid shell and mediates pinching off membrane in the budding process, it contains necessary informations in its structure. Two different morphogenic pathways of retroviral capsid assembly have been observed, denoted as (i) type C and (ii) type B/D. Gag polyproteins of type C retroviruses are targeted directly to the plasma membrane, where processes of the assembly and budding occur simultaneously. Type B/D retroviruses preassemble immature particles within cytoplasm, which are subsequently transported to the site of budding at the plasma membrane. In the budding process retroviruses utilize their late (L) domain motifs to recruit cellular proteins normally involved in protein sorting and vesicle formation into multivesicular body (MVB) compartment. In this manner retroviruses usurp endocytotic pathways and redirect it outward from the cell. Regardless of morphogenetic type of the retrovirus the expression of *gag*-gene polyprotein product in the absence of other viral components results in the efficient assembly and release of membrane-enveloped virus-like particles. During or shortly after the budding event polyprotein precursors creating nascent virus particles are cleaved into a number of distinct proteins by the virus encoded protease. This process called maturation includes dramatic rearrangements of the internal viral structure resulting in the infectious viral particle.

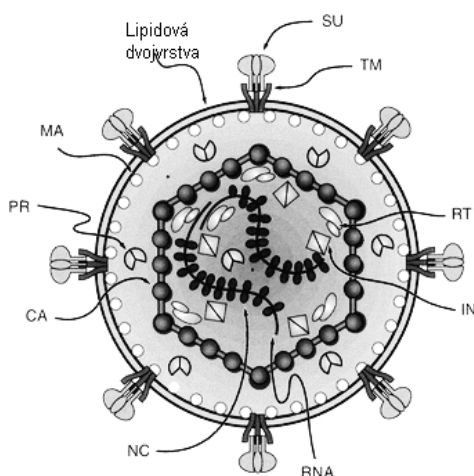
Keywords: retrovirus, Gag polyprotein, assembly, budding, L domains, MVB.

Obsah

1	Úvod.....	Error! Bookmark not defined.
1.1	Génom retrovírusov.....	Error! Bookmark not defined.
1.2	Produkty retrovírusových génov.....	Error! Bookmark not defined.
1.3	Životný cyklus retrovírusov.....	Error! Bookmark not defined.
1.4	Biosyntéza <i>pro</i> a <i>pro-pol</i> génových produktov.....	Error! Bookmark not defined.
1.5	Maturácia retrovírusových častíc.....	Error! Bookmark not defined.
2	Morfológia a morfogenéza retrovírusových viriónov.....	Error! Bookmark not defined.
3	Gag je prekuzorom vnútorných štruktúrnych proteínov retrovírusov.....	Error! Bookmark not defined.
3.1	Matrixový proteín.....	Error! Bookmark not defined.
3.2	Kapsidový proteín.....	Error! Bookmark not defined.
3.3	Nukleokapsidový proteín.....	Error! Bookmark not defined.
3.4	Iné proteínové a peptidové sekvencie v Gag polyproteíne.....	Error! Bookmark not defined.
4	Funkčné domény Gag polyproteínu.....	Error! Bookmark not defined.
4.1	M doména.....	Error! Bookmark not defined.
4.2	I doména.....	Error! Bookmark not defined.
4.3	L doména.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.1	HIV-1: prototyp L domény PTAP.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.2	RSV: prototyp L domény s PPxY motívom.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.3	EIAV: prototyp L domény s YxxL motívom....	Error! Bookmark not defined.
4.3.4	MPMV: retrovírus s L doménami PPPY i PSAP....	Error! Bookmark not defined.
5	Triedenie proteínov a formovanie vačkov v MVB.....	Error! Bookmark not defined.
5.1	Ubiquitín.....	Error! Bookmark not defined.
5.2	HRS komplex.....	Error! Bookmark not defined.
5.3	ESCRT-I.....	Error! Bookmark not defined.
5.4	ESCRT-II.....	Error! Bookmark not defined.
5.5	ESCRT-III.....	Error! Bookmark not defined.
5.6	AIP1/Alix.....	Error! Bookmark not defined.
5.7	Proteíny VPS4.....	Error! Bookmark not defined.
6	Interakcie L domén s bunčnými proteínmi.....	Error! Bookmark not defined.
6.1	L doména P(T/S)AP interaguje s TSG101.....	Error! Bookmark not defined.
6.2	L doména PPxY interaguje s Nedd4.....	Error! Bookmark not defined.
6.3	L doména YP(x) _n L interaguje s AIP1/ALIX.....	Error! Bookmark not defined.
6.4	Úloha proteazómov pri pučaní retrovírusov.....	Error! Bookmark not defined.
7	Záver.....	Error! Bookmark not defined.
8	Zoznam použitých skratiek.....	Error! Bookmark not defined.

1 Úvod

Retrovírusy (*Retroviridae*) sú obalené, živočíšne, (+)RNA vírusy, radené podľa Baltimora do VI. skupiny vzhľadom k DNA intermediátu v replikačnom cykle a ssRNA genómu (Baltimore, 1971). V ikosahedrálnej virióne (obr.1) s priemerom 80-100 nm nesú dve kópie lineárnej, ssRNA o veľkosti 7-11 kb, ktoré sú držané pohromade vodíkovými mostíkmi. Oba monoméry sú na 3'-konci polyadenylované a na 5'-konci majú čiapočkovú štruktúru typu 1 (metylovaný GDP viazaný na prvý nukleotid 5'-5' väzbou). Čiapočka ani polyadenylátový úsek nepatria ku genómovej časti RNA. Každý monomér je asociovaný so špecifickou molekulou transférovej RNA (tRNA), ktorej bázy párujú s oblasťou pri 5'-konci RNA označovanou ako primér viažúca oblasť, PBS (z angl. primer binding site). Genómová RNA nie je sama o sebe infekčná.

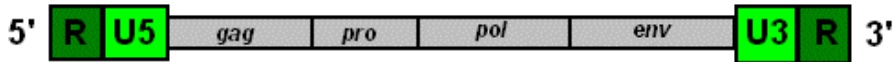


Obr. 1. Schématický nákres maturovanej retrovírusovej častice. Virión je obalený fosfolipidovou dvojvrstvou odvodnenou od plazmatickej membrány hostiteľskej bunky. Na povrchu sa nachádzajú povrchové (SU) proteíny, membránou prechádzajú transmembránové (TM) proteíny. Pod obalom je situovaný matrixový (MA) proteín, kapsidový (CA) proteín obklopuje komplex RNA s nukleokapsidovým (NC) proteínom. Vo virióne sa nachádzajú proteíny s enzýmovou funkciou: proteáza (PR), reverzná transkriptáza (RT) a integráza (IN). (Prevzaté zo Swanstrom a Wills, 1997.)

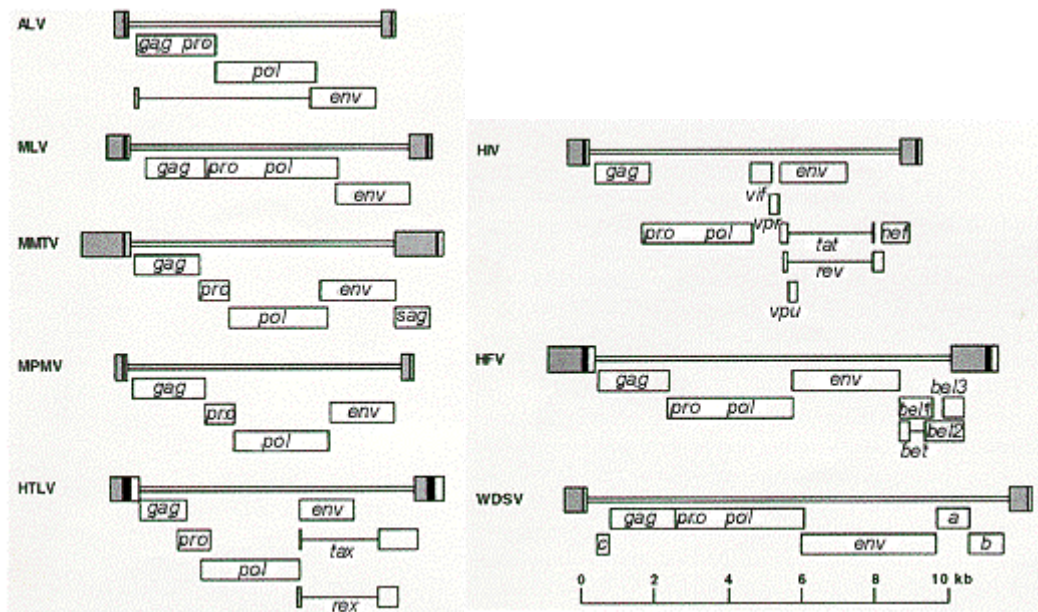
1.1 Génom retrovírusov

Replikačne kompetentné, infekčné retrovírusy majú štyri hlavné gény kódujúce štruktúrne a enzýmové komponenty viriónu v usporiadaní 5'-*gag-pro-pol-env*-3'. Génom začína na 5' konci repetíciou (R), za ňou nasleduje sekvencia unikátna pre tento koniec (U5). Repetícii (R) na 3' konci predchádza sekvencia unikátna pre tento koniec (U3). Gény *gag*, *pro*, *pol* a *env* sú lokalizované medzi U5 a U3 (obr. 2 a 3). Jednoduché retrovírusy, medzi ktoré patria napríklad vírus myšej leukémie (MLV), Mason-Pfizerov opičí vírus (MPMV) a vírus tumoru myšej prsnej žľazy (MMTV)

nesú len tieto štyri gény. Vírus ľudskej imunodeficiencie (HIV) alebo vírus ľudskej T leukémie (HTLV) majú navyše gény *tat* a *rev*, resp. *tax* a *rex* a patria medzi tzv. komplexné retrovírusy.



Obr. 2. Schéma zovšeobecneného retrovírusového (+)ssRNA genómu. 5' koniec, repetícia R, 5' proximálna jedinečná sekvencia U5, gény *gag*, *pro*, *pol* a *env*, 3' proximálna jedinečná sekvencia U3, repetícia R a 3' koniec.



Obr. 3. Genetická organizácia prototypických retrovírusov. Obdĺžniky s označením génov (viď text) značia otvorené čítacie rámce. Vertikálny posun obdĺžnikov značí odlišné čítacie rámce. Horizontálne úsečky spájajúce dva obdĺžniky značia fakultatívny exón. ALV – vírus vtáčej leukémie; MLV - vírus myšej leukémie; MMTV – vírus tumoru myšej prsnej žľazy; MPMV – Mason-Pfizerov opičí vírus; HTLV – vírus ľudskej T leukémie; HIV – vírus ľudskej imunodeficiencie, typ 1; HFV – ľudský penový vírus; WDSV – vírus Walley dermálneho sarkómu. (Prevzaté zo Swanstrom a Wills, 1997.)

1.2 Produkty retrovírusových génov

Produktom génu *gag* je polyproteín Gag, z ktorého pri proteolytickom štiepení v procese zvanom maturácia (viď kapitola 1.5) vznikajú matrixový (MA), kapsidový (CA) a nukleokapsidový (NC) proteín a v závislosti na druhu retrovírusu niektoré kratšie proteíny resp. peptidy.

Gén *pro* kóduje vírusovú aspartátovú proteázu (PR) uplatňujúcu sa v neskorých štádiách pučania retrovírusov pri proteolytickom spracovaní polyproteínových prekursorov v procese maturácie (viď kapitolu 1.5).

Génom *pol* sú kódované retrovírusové enzýmy zabezpečujúce replikáciu genómu. Prvým je reverzná transkriptáza (RT), RNA programovaná DNA polymeráza

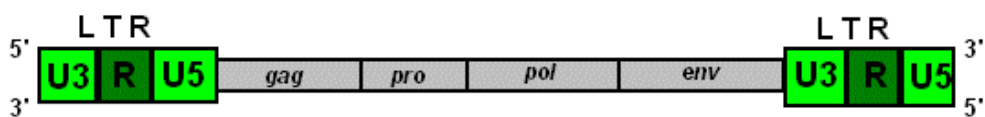
s aktivitou RNázy H. Druhým je integráza (IN) zabezpečujúca integráciu provírusovej DNA do hostiteľského chromozómu.

Gén *env* kóduje proteíny retrovírusového obalu: povrchový (SU) glykoproteín a transmembránový (TM) glykoproteín. Tie sprostredkujú špecifickú interakciu s povrchovými bunecnými receptormi. Polyproteínový prekurzor Env je syntetizovaný na drsnom endoplazmatickom retikule (RER) a štiepený bunecnou proteázou lokalizovanou v lumen RER na SU a TM proteíny.

Niektoré skupiny retrovírusov majú navyše gén *dut* kódujúci deoxyuridín trifosfatázu (dUTPázu, DU). Poloha tohto génu nie je v retrovírusovom genóme konzervovaná. U retrovírusov morfogenetických skupín B a D (viď 2. kapitola) je DU prekladaná v *pro* čítacom rámci, u neprimátích lentivírusov je prekladaná v *pol* čítacom rámci. (Zhrnuté v Swanstrom a Wills, 1997.)

1.3 Životný cyklus retrovírusov

Po prichytení povrchových glykoproteínov na špecifický receptor na povrchu permissívnej bunky dochádza k fúzii vírusového obalu s plazmatickou membránou hostiteľskej bunky. Fúzia je navodená konformačnou zmenou glykoproteínov na povrchu viriónu. Po uvoľnení obsahu viriónu do cytoplazmy začne RT, ktorá je súčasťou viriónu, prepisovať vírusovú genómovú (+)ssRNA do provírusovej dsDNA. Ako očko (primer) pre RT slúži transférová tRNA pochádzajúca z hostiteľskej bunky a špecificky asociovaná s genómovou RNA v oblasti PBS. Počas prepisu dochádza dvakrát k preskoku RT so vznikajúcou provírusovou DNA z jedného templátového vlákna RNA na druhé, príp. z jedného konca templátového vlákna na druhý. Týmto mechanizmom vzniká duplicita koncových regulačných oblastí, tzv. dlhé koncové repetície, LTR (z angl. long terminal repeats) (obr.4). V priebehu reverznej transkripcie je v cytoplazme vytvorený tzv. preintegračný komplex, ktorý transportuje provírusovú DNA do bunecného jadra. U HIV je tvorený *de novo* syntetizovanou provírusovou DNA, NC proteínom, štruktúrnym proteínom p6^{Gag}, integrázou (IN) a niekoľkými kópiami MA proteínu.



Obr. 4. Schéma zovšeobecnenej provírusovej dsDNA. 5' resp. 3' konce, LTR – dlhé kocové repetície tvorené 3' proximálnou jedinečnou sekvenciou (U3), repetíciou (R) a 5' proximálnou jedinečnou sekvenciou (U5). Gény *gag*, *pro*, *pol* a *env*.

Vírusová integráza katalyzuje integráciu lineárnej provírusovej dsDNA do hostiteľského chromozómu. Tím končí skorá fáza retrovírusovej replikácie. V neskorej fáze sa prebieha transkripcia provírusovej DNA hostiteľskou RNA polymerázou II a expresia retrovírusových génov. V RNA genóme je promótorová sekvencia umiestnená 3' proximálne a preskokom RT z 3' konca templátovej molekuly RNA na 5' koniec sa promótor v provírusovej DNA dostáva pred kódujúce sekvencie. Vznikajúce molekuly mediátorovej RNA (mRNA) sú v jadre opatrené čiapočkovou štruktúrou (z angl. cap) na 5' konci, na 3' konci polyadenylátovým úsekom a podliehajú zostrihu (z angl. splicing). Oblasť *gag-pol* ohraničená donorovým a akceptorovým miestom zostrihu môže byť vystrihnutá z RNA transkriptu provírusu ako fakultatívny intrón a zostrihnutá subgenómová verzia RNA transkriptu slúži ako mRNA pre proteíny retrovírusového obalu (*env*-mRNA). Enkapsidačný signál ψ sa nachádza v 5' proximálnej oblasti génu *gag* a preto subgenómové *env*-mRNA nemôžu byť enkapsidované. (Zhrnuté v Swanstrom a Wills, 1997.)

(O translácii *gag* génových produktov je pojednané na začiatku 3. kapitoly.)

1.4 Biosyntéza *pro* a *pro-pol* génových produktov

Sekvencie kódujúce retrovírusové enzýmy protázu (PR), reverznú transkriptázu (RT) a integrázu (IN) sú lokalizované uprostred genómu (obr. 4) a promótor sa nachádza v provírusovej DNA 5' proximálne pred génom *gag*. Produkty týchto génov musia byť taktiež vo vnútri bunky smerované na miesto tvorby viriónov. Ich translácia prebieha z nezostrihutej genómovej mRNA a jej produktom je polyproteínový prekurzor začínajúci na N-konci sekvenciou Gag polyproteínu a na C-konci predĺžený o sekvenciu Pro, resp. Pol.

V prípade vírusu Rousovho sarkómu (RSV) a HIV dochádza na rozhraní génov *gag* a *pol* k ribozomálnemu posunu čítacieho rámca o -1 nukleotid. Po tomto posune pokračuje ribozóm v translácii génu *pol* a produktom je Gag-Pol fúzny polyproteín. K tejto udalosti dochádza s pravdepodobnosťou 5% a tým je regulovaná hladina proteínov s enzýmovou funkciou inkorporovaných do viriónu. Sekvencia *pro* je u RSV a HIV súčasťou génu *pol* (obr. 3).

U MMTV, MPMV, HTLV sú gény *pro* a *pol* v odlišných čítacích rámcoch (obr. 3). Pre vytvorenie Gag-Pro a Gag-Pro-Pol fúznych polyproteínových prekurzorov musí nastať ribozomálny posun čítacieho rámca raz, resp. dvakrát.

U MLV sú gény *gag* a *pol* v rovnakom čítacom rámci (obr. 3). Fúzny polyproteínový prekurzor Gag-Pol vzniká s pravdepodobnosťou 5% účinkom supresorovej tRNA, ktorá ribozómu umožní prečítať sa stop kodónom na konci sekvencie génu *gag*.

Pre väčšinu retrovírusov platí, že prekurzorové proteíny predstavujú zymogény, enzymaticky neaktívne formy PR a RT, ktoré sa aktivujú v neskorých fázach replikačného cyklu retrovírusov (zhrnuté v Hunter, 1994).

1.5 Maturácia retrovírusových častíc

Retrovírusová aspartátová proteáza (PR), produkt génu *pro*, býva aktivovaná počas pučania a účastní sa proteolytického spracovania Gag prekurzorových molekúl. Takto vznikajú z Gag polyproteínov tri vnútorné štruktúrne proteíny spoločné všetkým retrovírusom (MA, CA a NC; ich funkcie pri tvorbe vírusovej častice sú popísané v 3. kapitole) a kratšie proteíny a peptidy charakteristické pre jednotlivé druhy retrovírusov. Po proteolýze Gag prekurzoru zostáva MA asociovaný s vnútornou stranou membrány vírusového obalu a CA vytvorí plášť (z angl. shell) obklopujúci komplex genómovej RNA s NC. Nezrelé retrovírusové častice sa od maturovaných líšia morfológiou pozorovanou v elektrónovom mikroskope (obr. 5) (zhrnuté vo Vogt, 1997). Význam maturácie je podložený odlišnými požiadavkami kladenými na Gag polyproteín na rozdiel od jednotlivých proteínov obsiahnutých v Gag sekvencii. Molekuly Gag musia počas zbaľovania interagovať aby vytvorili multimérne štruktúry a smerovať k plazmatickej membráne. Naopak, po vstupe retrovírusu do hostiteľskej bunky sa musia proteíny pôvodne obsiahnuté v sekvencii Gag polyproteínového prekurzoru rozvoľniť a smerovať k bunecnému jadrú.

2 Morfológia a morfogenéza retrovírusových viriónov

Retrovírusy sa pôvodne rozdeľovali podľa morfológie viriónov pozorovaných v elektrónovom mikroskope (obr 5). Určujúcimi znakmi boli tvar a poloha nukleokapsidového jadra (core) a miesto tvorby vírusových častíc (obr. 6).

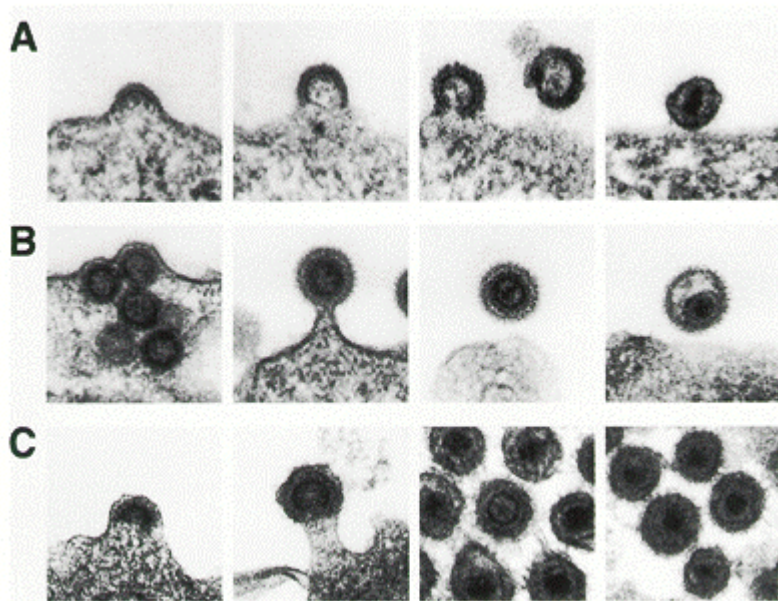
- Retrovírusy typu A tvoria vnútrobunecné častice s tenkým plášťom a jasným jadrom, primárne pučiace na vnútrobunecných membránach*.

* Tieto častice sú v súčasnosti považované za nematurované kapsidy predchádzajúce iným štruktúram. Tento termín sa už nepoužíva ku klasifikácii, ale popisuje štruktúry tvorené vírusom podobnými, vnútrobunecnými retrotranspozónami. Označujú sa ako IAPs (z angl. intracisternal A-type particles; Kuff E. L., Lauders, K. K., 1988)

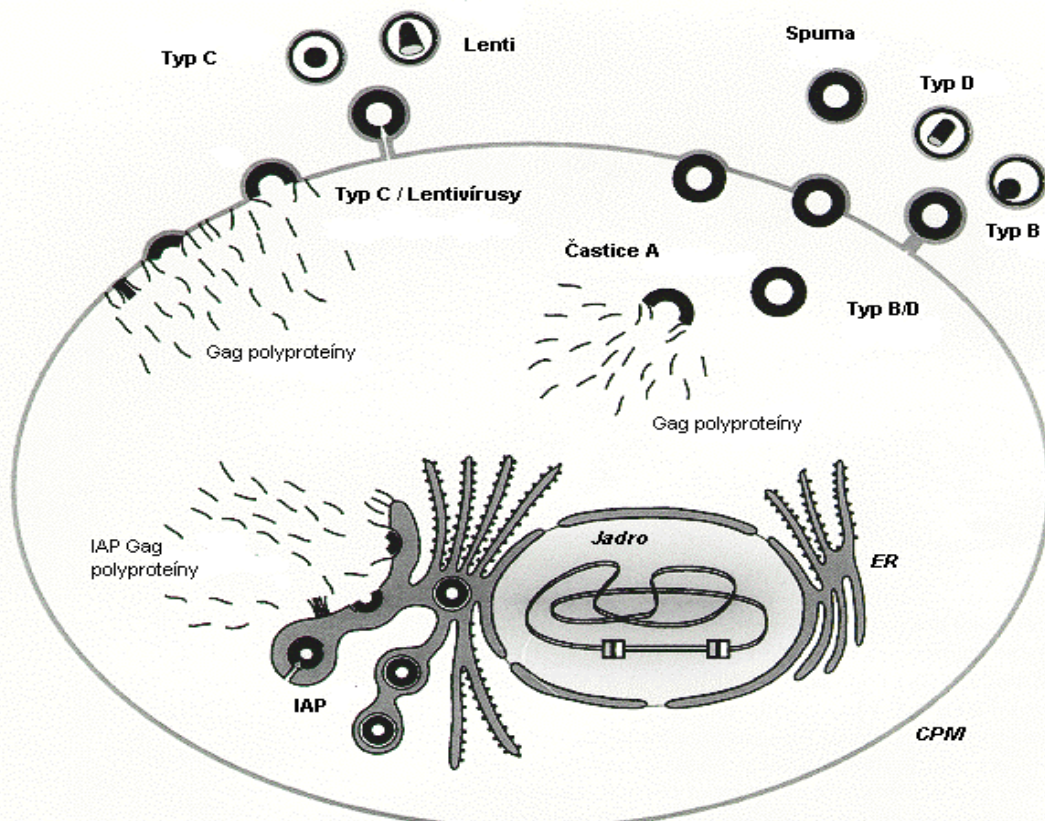
- Retrovírusy typu B sú charakteristické sférickým, excentricky položeným vnútorným jadrom. Zbaliujú sa v cytoplazme cez intermediáty typu A. Preformované kapsidy sú následne transportované na cytoplazmatickú membránu, kde pučia z bunky.
- Retrovírusy typu C obsahujú centrálne, symetricky uložené jadro a ich častice sa formujú na membráne. Makromolekulárne agregáty Gag molekúl a polyproteínov asociovaných s Gag sa spočiatku javia ako elektrónodenzné polia na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány hostiteľskej bunky, kde súčasne s tvorbou vírusových častíc prebieha proces pučania.
- Retrovírusy typu D sa formujú v cytoplazme cez intermediáty typu A a tak ako u typu B sú pre následné pučanie transportované na cytoplazmatickú membránu. Pre maturované virióny je charakteristické cylindrické jadro.

Rod	Typ	Prototyp
Podčeľaď Orthoretrovirinae		
<i>Alpharetrovirus</i>	C - vtácie (ASLV)	RSV
<i>Betaretrovirus</i>	B	MMTV
	D	MPMV
<i>Gammaretrovirus</i>	C - cicavčie	MLV
<i>Deltaretrovirus</i>	BLV / HTLV-1	
<i>Epsilonretrovirus</i>	WDSV	
<i>Lentivirus</i>	Lenti	HIV-1
Podčeľaď Spumaretrovirinae		
<i>Spumavirus</i>	Spuma	HFW

Tab. 1. Taxonomické rozdelenie čeľaďe *Retroviridae* a rozdelenie podľa typu morfológie/morfogenézy častíc a hostiteľského spektra. Uvedení sú prototypický zástupcovia jednotlivých taxónov/typov. ASLV – vírusy sarkómov a leukémie vtákov; RSV - vírus Rousovho sarkómu; MMTV - vírus tumoru myšej prsnej žľazy; MPMV - Masonov-Pfizerov opičí vírus; MLV - vírus myšej leukémie; BLV - vírus leukémie hovädzieho dobytku; HTLV-1 – vírus ľudskej T leukémie, typ 1; WDSV – vírus Walley dermálneho sarkómu; HIV-1 – vírus ľudskej imunodeficiencie, typ 1; HFW - ľudský penový vírus. Lenti – z lat. pomalý; Spuma – z lat. pena; ostatné retrovírusy sa označujú ako tzv onkovírusy. (Spracované podľa Coffin et al, 1997 a International Committee on Taxonomy of Retroviruses).



Obr. 5. Morfogenéza troch odlišných retrovírusov. (A) HIV-1: zbaľovanie a pučanie na membráne zachytáva nematurované i maturované častice (Prevzaté podľa Swanstrom et al., 1990 zo Swanstrom a Wills, 1997). (B) MMTV: formovanie častíc v cytoplazme a následné pučanie (Prevzaté od M. Gonda podľa Coffin, 1992 zo Swanstrom a Wills, 1997). (C) ASLV: Formovanie častíc na membráne s následným pučaním. (Prevzaté podľa Craven et al., 1995 zo Swanstrom a Wills, 1997.)



Obr. 6. Tri cesty zbaľovania retrovírusov. Retrovírusy typu C vytvárajú častice súčasne s ich obaľovaním a pučaním na membráne. Podobne sa chovajú IAPs ale s tým rozdielom, že pučia výlučne cez vnútrobunecné membrány. Retrovírusy typu B a D vytvárajú častice v cytoplazme. Tie sú následne transportované na membránu a pri pučaní získavajú obal. Spumaretrovírusy taktiež vytvárajú častice v cytoplazme ale počas/po pučení nepodliehajú maturácii. ER – endoplazmatické retikulum; CPM – cytoplazmatická membrána. (Prevzaté z Coffin et al., 1997.)

3 Gag je prekuzorom vnútorých štruktúrnych proteínov retrovírusov.

Produkt génu *gag*, Gag polyproteínový prekuzor, je prekladaný na voľných polyzómoch v cytoplazme hostiteľskej bunky z nezostrihutej genómovej mRNA. Gag polyproteín má kľúčovú úlohu pri formovaní retrovírusových častíc, pričom približne 2000 Gag molekúl vytvára jeden virión s hustotou 1,16-1,18 g.cm⁻³. Expresia génu *gag* i v neprítomnosti ostatných retrovírusami kódovaných komponent má schopnosť riadiť formovanie a uvoľňovanie membránou obalených, vírusom podobných častíc označovaných VLPs (z angl. virus-like particles) (zhrnuté v Hunter, 1994; Swanstrom a Wills, 1997).

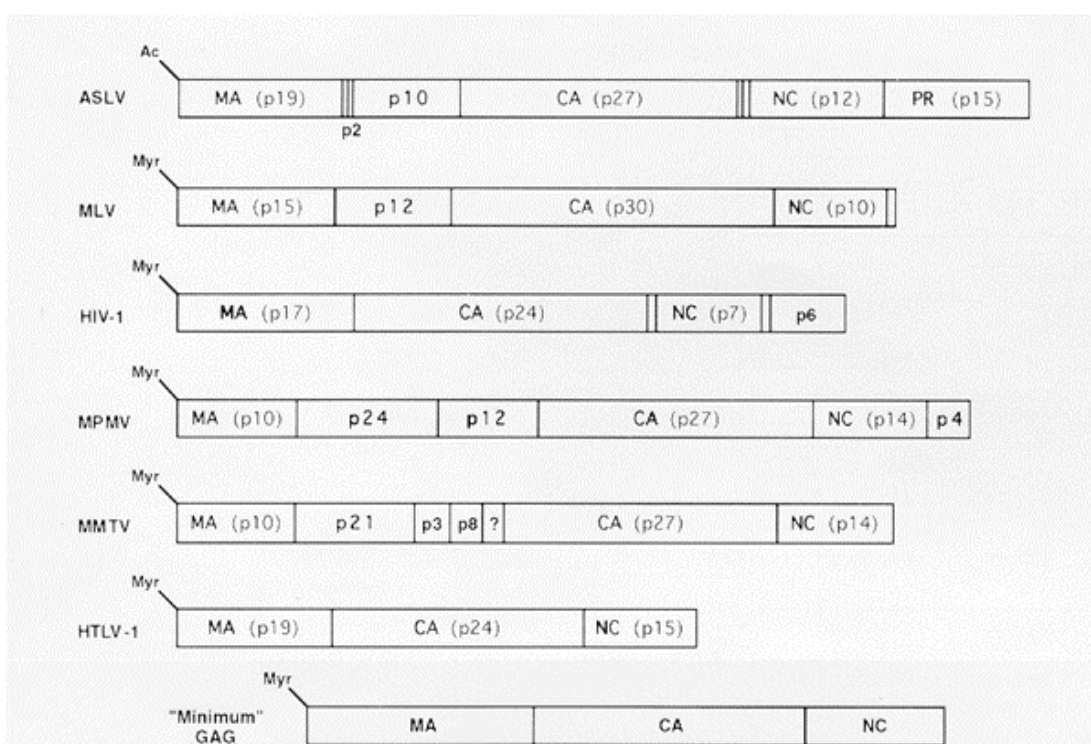
Vogt a Eisenman (1973) použitím potkaních protilátok proti proteínom vírusu vtáčej myeloblastózy (AMV) selektívne precipitovali *de novo* syntetizované intracelulárne vírusové proteíny z kuracích buniek infikovaných AMV. Bunky boli predtým metabolicky značené ³⁵S-metionínom a vyizolované proteíny boli rozdelené pomocou denaturujúcej polyakrylamidovej gélovej elektroforézy s dodecylsulfátom sodným (SDS-PAGE). Namiesto očakávaných hlavných viriónových proteínov (Hung et al., 1971) objavili dva markantné, vírusovo špecifické proteíny s molekulovou hmotnosťou 76 kDa a 12 kDa spolu s menším množstvom ostatných značených proteínov a dokázali, že väčší polyproteín je prekuzorom najmenej dvoch hlavných viriónových proteínov s molekulovou hmotnosťou 24 kDa a 11 kDa a menší je prekuzorom 11 kDa viriónového proteínu.

Neskôr Jamjooon a spolupracovníci (1974) objavili v N.I.H. Swiss mouse embryo bunkách infikovaných Rauscherovou líniou MLV proteín s molekulovou hmotnosťou 70 kDa charakteristický pre tento vírus. Trypsínovým štiepením viriónového a intracelulárneho 70 kDa polypeptidu značeného ³⁵S-metionínom dokázali, že sú identické. Navyše oba obsahovali peptidové sekvencie charakteristické pre viriónový p30 štiepený trypsinom, čo dokazuje, že mohli byť jeho potenciálnym prekuzorom.

Označenie polyproteínu Gag vzniklo ako skratka z angl. *group specific antigen*. Základom pre toto značenie bolo pozorovanie, že sérum zo škrečka obsahujúce protilátky proti Schmidt-Ruppinovej línii vírusu vtáčieho sarkómu (ASV) reaguje aj s Bryanovou líniou RSV a inými reprezentatívnymi líniami ASV (Huebner et al., 1964).

Gag je rozdelený do oblastí, ktoré sú pri maturácii viriónu proteolyticky štiepené vírusovou proteázou (PR, produkt génu *pro*). Takto z prekuzorového polyproteínu

vznikajú minimálne tri vnútorné štruktúrne proteíny spoločné všetkým retrovírusom. Označujú sa ako (i) matrixový (MA, z angl. **matrix** alebo **membrane associated**), (ii) kapsidový (CA, z angl. **capsid**) a (iii) nukleokapsidový (NC, z angl. **nucleo capsid**) proteín (Leis et al., 1977). Gag polyproteíny sú u všetkých retrovírusov organizované v rovnakom poradí: (N)-MA-X-CA-NC-Y-(C) (obr. 7). X a Y značia segmenty, z ktorých môže vzniknúť jeden alebo viacero menších proteínov, resp. peptidov, alebo sa nemusia vyskytovať vôbec (zhrnuté vo Vogt, 1997). Výnimkou sú spumaretrovírusy, ktorých Gag nie je proteolyticky štiepený. Tento rod sa v mnohom odlišuje od ostatných retrovírusov a preto nebude ďalej diskutovaný.



Obr. 7. Schématická organizácia Gag polyproteínov u prototypických zástupcov jednotlivých retrovírusových rodov. Jednotlivé domény (MA – matrixová, CA – kapsidová, NC – nukleokapsidová, PR – proteáza) sú oddelené vertikálnymi úsečkami, ktoré značia štiepiace miesto pre vírusovú proteázu. ASLV – vírus sarkómu a leukémie vtákov; MLV – vírus myšej leukémie; HIV-1 – vírus ľudskej imunodefície, typ 1; MPMV – Masonov-Pfizerov opičí vírus; MMTV – vírus tumoru myšej prsnej žľazy; HTLV-1 – vírus ľudskej T leukémie, typ 1.

3.1 Matrixový proteín

Matrixový proteín (MA) tvorí aminoterminálnu časť Gag polyproteínov všetkých retrovírusov. Podľa väčšiny biochemických kritérií sa javí ako periférny membránový proteín (zhrnuté vo Vogt, 1997).

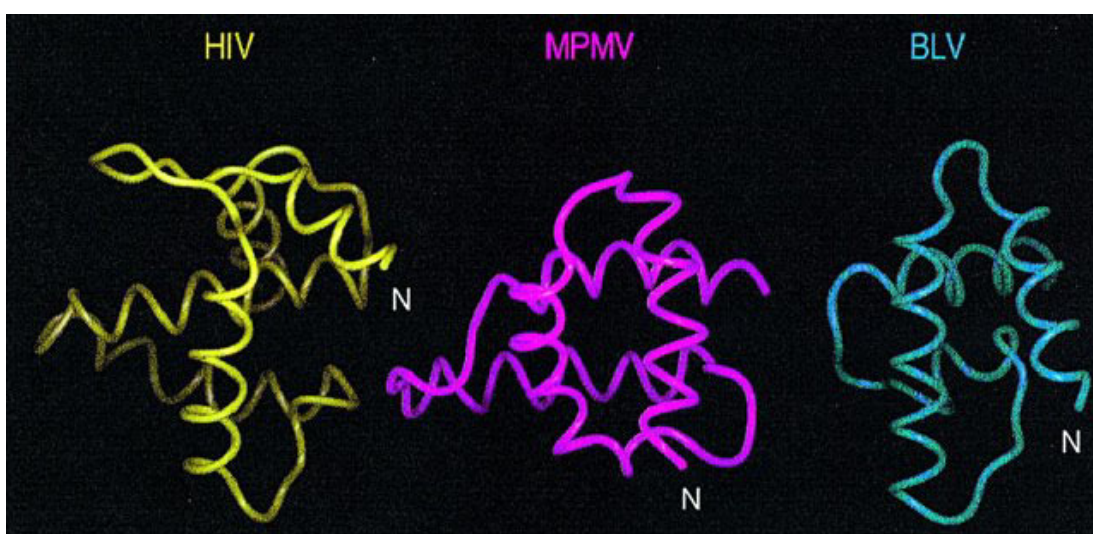
Priestorové priblíženie proteínov a membránových fosfolipidov bolo študované použitím symetrických bifunkčných činidiel, ktoré vytvárajú amidovú väzbu medzi primárnymi aminoskupinami. Pepinsky a Vogt (1979) pomocou dimetylsuberimidátu kovalentne prepojili v jednom prípade MA proteín vírusu sarkómu a leukémie vtákov (ASLV) a v druhom prípade MLV s fosfatidyletanolamínom špecificky rádioaktívne značeným ^{14}C -etanolamínom. Lipid-proteínové komplexy separovali pomocou SDS-PAGE a vizualizovali fluorogramom. Za interakcie proteínu s lipidmi vírusového obalu je zodpovedná aminoterminálna oblasť ASLV MA proteínu ($\text{p}19^{\text{gag}}$). Cystínové zvyšky v karboxyterminálnej oblasti MA vytvárajú pomocou disulfidických väzieb homotypické intermolekulárne interakcie (Pepinsky a Vogt, 1984). Z toho vyplýva že hlavné štruktúrne rysy ASLV sú reprezentované špecifickými interakciami MA proteínu s fosfolipidmi vírusového obalu a medzi MA proteínmi navzájom.

Matrixový proteín väčšiny retrovírusov je kotranslačne modifikovaný acyláciou. Vo väčšine prípadov sa jedná o zvyšok kyseliny myristylovej, menej často o acetylový zvyšok. Konsenzus sekvencie slúžiacej ako signál pre myristyláciu je Met-Gly-X-X-Ser/Thr. Po odštiepení iniciačného metionylu je vytvorená amidová väzba medzi zvyškom kyseliny myristylovej a glycinovým zvyškom (Vogt, V., 1997).

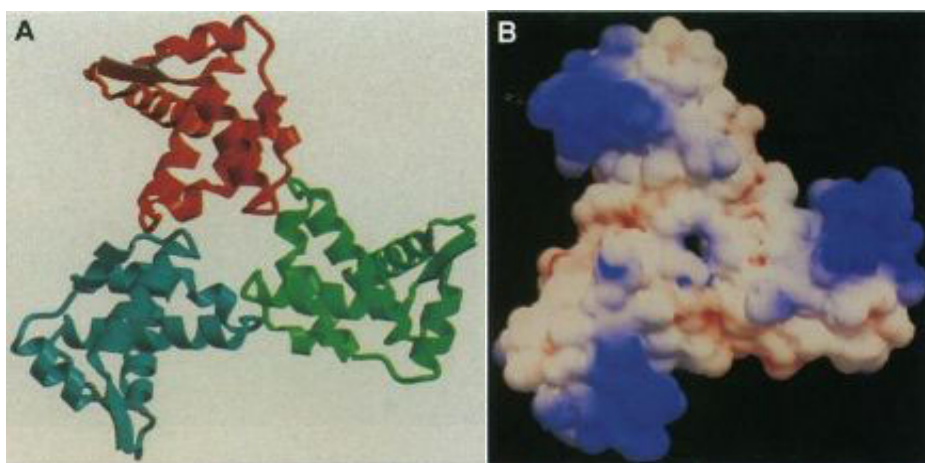
Zvyšok kyseliny myristylovej [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$] naviazaný na aminoterminálny glycin bol prvý krát objavený u MA proteínu ($\text{p}15^{\text{Gag}}$) Rauscherovej línie MLV a Moloneyho línie MLV (morfofenetický typ C). Táto modifikácia udeľuje proteínu značnú hydrofobicitu (Henderson et al., 1983). Metabolickým značením ^3H -myristylovou kyselinou bola neskôr dokázaná N-koncová myristylácia u Gag prekurzorových polyproteínov MMTV (morfofenetický typ B) a MPMV (morfofenetický typ D). Ku Gag prekurzorovým polyproteínom RSV ($\text{Pr}76^{\text{Gag}}$) však ^3H -myristylová kyselina inkorporovaná nebola (Schultz a Oroszlan, 1983). Z toho vyplýva, že myristylácia MA proteínu je spoločným znakom cicavčích retrovírusov typu B, C a D ale nie vtáčích retrovírusov.

Trojrozmerná štruktúra MA proteínu HIV-1 (cicavčí retrovírus morfofenetického typu C), určená röntgenovou kryštalografiou, je tvorená piatimi hlavnými helixami, ktoré sú kryté trojvláknovým β -listom (obr. 8). Tento proteín vytvára pri kryštalizácii triméry (obr. 9), pričom vzniká povrch účastníci sa väzby na membránu (obr. 10; vid' kapitola 5.1) (Hill et al., 1996).

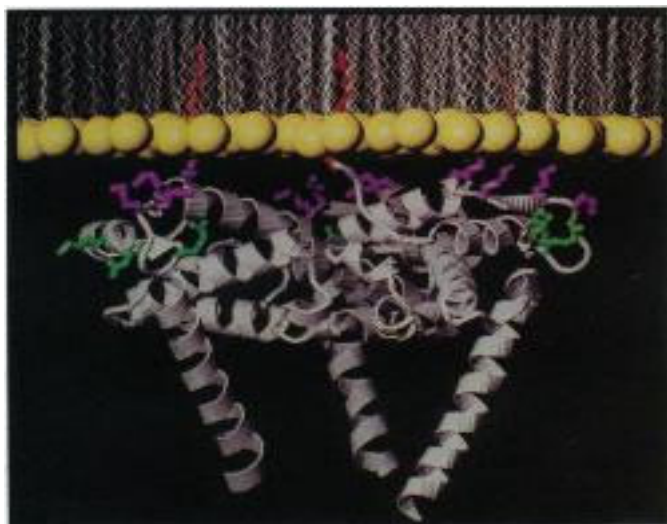
Conte so spolupracovníkmi (1997) určila trojrozmernú štruktúru MA proteínu MPMV (cicavčí retrovírus morfogenetického typu D) v roztoku, pomocou heteronukleárnej nukleárnej magnetickej rezonancie. Tento proteín sa v roztoku vyskytuje ako monomér tvorený štyrmi tesne zbalenými α -helixami. Jeho štruktúra je podobná so štruktúrou MA molekúl cicavčích retrovírusov typu C (obr.8). Na povrchu molekuly sa nachádzajú dve kladne nabité oblasti. Jedna z nich je analogická aminoterminálnej bázičkej oblasti MA proteínov cicavčích retrovírusov typu C, zatiaľ čo druhá nebola pozorovaná u MA proteínov cicavčích retrovírusov typu C. Trimerizácia MPMV MA molekúl vytvára bipartitný, s membránou asociujúci signál (Conte et al., 1997).



Obr. 8. Ukážka štruktúry MA proteínov vírusu ľudskej imunodeficiencie (HIV), Masonovho-Pfizerovho opičieho vírusu (MPMV) a vírusu leukémie hovädzieho dobytku (BLV). N značí aminokonec. (Prevzaté z Conte et al., 1997).



Obr. 9. (A) Pohľad na stužkový model matrixového triméru tvaru triskeliónu pozdĺž trojpočetnej osy symetrie. Jednotlivé podjednotky znázornené červeno, zeleno a modro. (B) Priestorový model triméru z obrázku A. Modro sú znázornené kladné náboje. (Prevzaté z Hill *et al.*, 1996.)



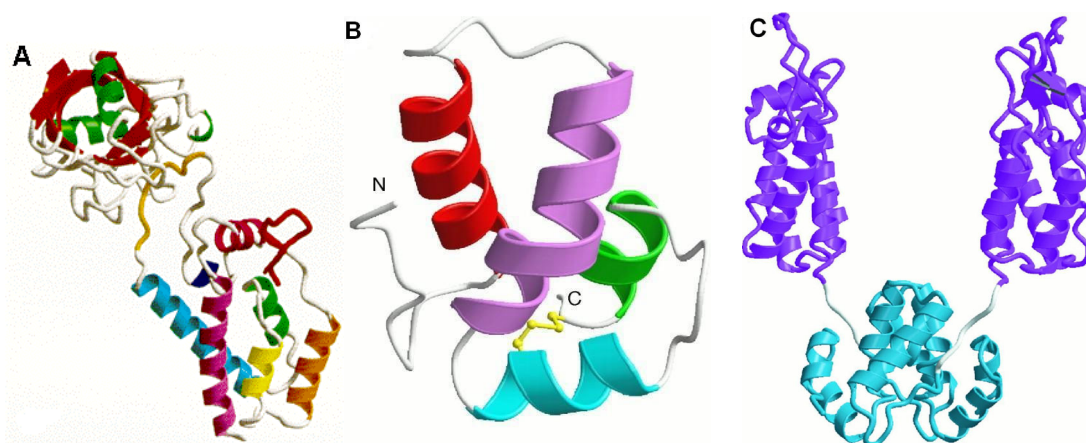
Obr. 10. Schématický model interakcie matrixového triméru s membránou. Znárodné sú postranné reťazce bázičkových zvyškov, ktoré sú esenciálne (fialová) alebo neesenciálne (zelená) pre optimálnu replikáciu vírusu. Zvyšky kyseliny myristilovej (červená) sú zanorené do modelu fofolipidovej membrány (Prevzaté z Hill *et al.*, 1996).

3.2 Kapsidový proteín

Kapsidový proteín je najväčším retrovírusovým proteínom vznikajúcim proteolytickým štiepením Gag prekursoru. V maturovanom virióne vytvára vnútorný proteínový plášť (angl. shell) obklopujúci vírusový RNA genóm spolu s asociovanými proteínmi. Kapsidový plášť spolu komponentami v jeho vnútri vytvára vírusové jadro (angl. core) (zhrnuté vo Vogt, V., 1997) Je tvorený dvoma doménami: aminoterminálnou (NTD) vytvárajúcou spomínaný plášť a karboxyterminálnou (CTD), ktorej hlavnou funkciou je sprostredkovať homodimerizáciu Gag molekúl (obr. 10) pri tvorbe nezrelých vírusových častíc vo vnútri hostiteľskej bunky. Aminoterminálna doména HIV-1 CA pozostáva z aminokyselinových zvyškov 1-145, karboxyterminálna zo zvyškov 148-231 a navzájom sú prepojené zvyškami 146 a 147. Röntgenová kryštalografia odhalila, že HIV-1 CA CTD viaže ľudskú peptidyl prolyl *cis-trans* izomerázu cyklofilín A (CypA; Obr. 11A). Exponovaná slučka tvorená zvyškami 85-93 viaže aktívne miesto enzýmu a Pro-90 zaujíma neobvyklú *trans* konformáciu. V kryštálovej mriežke sú kapsidové molekuly zostavené v súvislých rovinných pásoch. Postranným spojením týchto pásov by mohli kapsidové molekuly vytvárať povrch vírového jadra. Cyklofilín A by potom mohol zoslabovať tieto spoje a umožniť tak rozvoľnenie jadra po vstupe víru do hostiteľskej bunky (Gambille et al., 1996).

Nezávisle na štruktúre NTD bola získaná i kryštáľová štruktúra CTD HIV-1 CA proteínu (obr. 11B). V tejto doméne sa nachádza oblasť 20 aminokyselinových zvyškov významnej homológie, MHR (z angl. major homology region). Tento segment je konzervovaný u všetkých retrovírusov, s výnimkou spumaretrovírusov

(zhrnuté vo Vogt, V., 1997) a je nepostrádateľný pre zbaľovanie, maturáciu a infektivitu retrovírusov. Konzervované aminokyselinové zvyšky MHR (153-172) v CA proteíne HIV-1 vytvárajú v kryštálovej štruktúre sieť vodíkových väzieb, ktorá stabilizuje konformáciu CTD (Gambille et al., 1997). Genetická analýza CA proteínu RSV odhalila, že až na MHR (aminokyselinové zvyšky 156-175), sa nejedná o esenciálnu súčasť mašinerie zodpovednej za pučanie retrovírusov. Z tejto analýzy Craven so spolupracovníkmi (1995) vyvodzujú, že funkcie sprostredkované MHR sú vyžadované v neskorých fázach maturácie retrovírusových viriónov a že sú esenciálne pre správnu funkciu vírusového jadra po vstupe do novej hostiteľskej bunky.



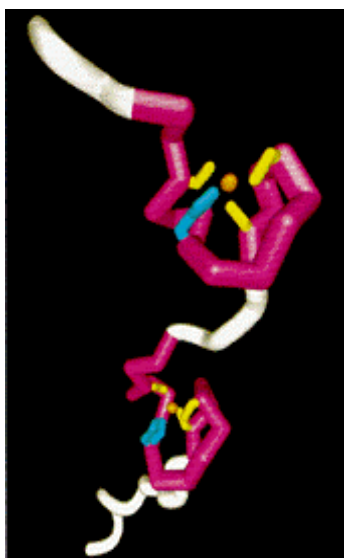
Obr. 11. (Predchádzajúca strana.) Stužkové modely kapsidových proteínov HIV-1 získané röntgenovou kryštalografiou, v zátvorkách uvedené čísla aminokyselinových zvyškov. (A) NTD HIV-1 CA₁₋₁₅₁ (vpravo dole) v komplexe s CypA (vľavo hore) Všetky helixy sú α okrem posledných troch aminokyselinových zvyškov tvoriacich 3_{10} helix. Červená β -slučka (1-13), oranžová helix 1 (17-29), žltá helix 2 (36-43), zelená helix 3 (49- 57), purpurová helix 4 (63-83), tyrkisová helix 5 (101-104), červená helix 6 (111-119) a ružová helix 7 (126-145). CypA β -vlákna znázornené červeno a helixy zeleno. Prevzaté z Gambille et al., 1996. (B) CTD HIV-1 CA₁₅₁₋₂₃₁. Žltá je zobrazená disulfidická väzba medzi Cys198 a Cys218, červeno helix 1 (11-24), fialovo helix 2, azúrovo helix 3, zeleno helix 4. (C) HIV-1 CA homodimer. CA₁₄₆₋₂₃₁ homodimer (azúrová) je kovalentne viazaný s CA₁₋₁₅₁ doménou (fialová). (B) a (C) prevzaté z Gambille et al. 1997.

Doposiaľ bola vyriešená trojrozmerná štruktúra CA proteínov vírusu konskej infekčnej anémie (EIAV), HIV-1, HTLV a RSV. Charakteristické sú pre ne helikálne NTD a CTD spojené krátkym flexibilným ramienkom (von Schwedler et al., 2003). Štruktúra celistvého kapsidového proteínu nebola doposiaľ získaná. Z toho prameňa menšie odchýlky vo vymedzení aminokyselinových zvyškov tvoriacich jednu alebo druhú doménu. Pri kryštalografickej analýze NTD CA proteínu HIV-1 bola táto doména tvorená aminokyselinovými zvyškami 1-151 (Gambille et al., 1996), zatiaľ čo pri kryštalografickej analýze CTD CA proteínu

HIV-1 bola táto doména tvorená v jednom prípade aminokyselinovými zvyškami 146-231 a v druhom prípade 151-231. Obe vytvárali zhodné kryštály a preto bola detailne popísaná len doména pozostávajúca zo zvyškov 151-231. Model celého kapsidového proteínu HIV-1 (obr. 11C) bol vytvorený kombináciou homodiméru CTD CA₁₄₆₋₂₃₁ s kryštálovou štruktúrou NTD CA₁₋₁₅₁. Spoj týchto domén tvoria u HIV-1 zvyšky 146 a 147 (Gambille et al., 1997).

3.3 Nukleokapsidový proteín

Nukleokapsidový proteín je malý bázičný proteín lokalizovaný v karboxyterminálnej časti retrovirusových Gag polyproteínov. U všetkých retrovirusov s výnimkou spumaretrovirusov obsahuje vysoko konzervovaný motív zložený s cysteinových a histidínových zvyškov (obr. 12). Tento motív má štruktúru Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys (X značí ľubovoľnú aminokyselinu s tým, že medzi prvými dvomi cysteinovými zvyškami sa nevyskytujú aromatické aminokyselinové zvyšky) a taktiež býva označovaný ako CCHC motív. Tento motív je totožný s motívom zvaným zinkový prst (z angl. zinc finger), ktorý sa vyskytuje i v iných proteínoch a je schopný koordinačne viazať zinočnatý kation. Retrovirusové nukleokapsidové proteíny môžu obsahovať jeden alebo dve takéto motívy (Bess et al., 1992). Nukleokapsidový proteín stimuluje asociáciu komplementárnych sekvencií RNA čo má za následok (i) dimerizáciu genómovej RNA a (ii) asociáciu tRNA slúžiacej ako očko (primer) pre reverznú transkripciu. Tieto funkcie vykazuje syntetický NC proteín HIV-1 obsahujúci dva motívy zinkového prstu aj po ich odstránení. Odstránenie bázičných aminokyselinových zvyškov susediacich s prvým zinkovým prstom však vedie



k úplnej strate aktivity. Predpokladá sa, že bázičné zvyšky kooperujú so zinkovými prstami pri výbere a zbaľovaní genómovej RNA (Rocquigny et al., 1992).

Nukleokapsidový proteín bol po proteáze a RNázovej doméne reverznej transkriptázy tretím proteínom pochádzajúcim z HIV-1 u ktorého bola určená trojrozmerná štruktúra (obr. 12).

Obr. 12. (Predchádzajúca strana.) Model polypeptidovej kostry HIV NC monoméru získaný nukleárnou magnetickou rezonanciou. Biela neštruktúrované polypeptidové úseky, ružová zinkové prsty, žltá cysteinové a modrá histidínové zvyšky koordinačne viažúce zinočnatý kation zobrazený žltá (Prevzaté z Coffin et al., 1997, podľa Summers et al., 1992).

Na rozdiel od predchádzajúcich dvoch proteínov, ktoré boli skúmané röntgenovou kryštalografiou bola, štruktúra NC proteínu v roztoku určená za pomoci nukleárnej magnetickej rezonancie. Ukázalo sa, že CCHC motív existuje ako nezávisle zbalená a neinteragujúca doména na flexibilnom polypeptidovom reťazci. V tejto oblasti sa nachádzajú konzervované aromatické aminokyselinové zvyšky tvoriace hydrofóbne oblasti na povrchu zinkových prstov, ktoré sú esenciálne pre rozpoznanie RNA genómu (Summers et al., 1992).

Nukleokapsidový proteín má dôležitú funkciu pri rozpoznávaní a enkapsidácii genómovej RNA. Tá obsahuje vo vedúcej (z angl. leader) oblasti (5' proximálna časť kódujúcej oblasti) komplexnú sekvenciu, tzv. enkapsidačný signál označovaný ψ (zhrnuté vo Vogt, 1997). Syntetický peptid so sekvenciou aminoterminálnej oblasti CCHC zinkového prstu HIV-1 NC proteínu špecificky viaže oligodeoxyribonukleotid analogický s esenciálnou časťou enkapsidačného signálu. Oligodeoxyribonukleová kyselina je viazaná v jednovláknovej A konformácii a táto väzba je závislá na koordinačne viazanom zinočnatom katióne. Asociácia nukleovej kyseliny s proteínom je podmienená hydrofóbnymi interakciami a vodíkovými mostíkmi medzi postrannými reťazcami aminokyselín s nukleovou kyselinou a stabilizovaná elektrostatickými interakciami s fosfodiesterovou kostrou nukleovej kyseliny (South a Summers, 1993).

3.4 Iné proteínové a peptidové sekvencie v Gag polyproteíne

Okrem funkčne konzervovaných MA, CA a NC domén môže prekursor Gag v závislosti na druhu retrovírusu obsahovať ďalšie proteínové, resp. peptidové sekvencie. Napríklad u RSV a MLV sa jedná o p10, resp. p12, bohaté na prolín a lokalizované proximálne k C-koncu MA domény (obr. 7). Úloha týchto domén v replikačnom cykle RSV, resp. MLV, nie je jasná, navyše mutačná analýza ukázala, že nie sú potrebné ani pre samotný proces vytvárania vírusových kapsíd. Viaceré krátke, nepomenované domény obsiahnuté v Gag polyproteínovom prekuzore by mohli slúžiť ako medzerníky (z angl. spacer) uľahčujúce správne zbalenie (z angl. folding) a následné úpravy (z angl. processing) prekursorových molekúl. Alternatívne, keďže prekursorový polyproteín je stavebnou jednotkou

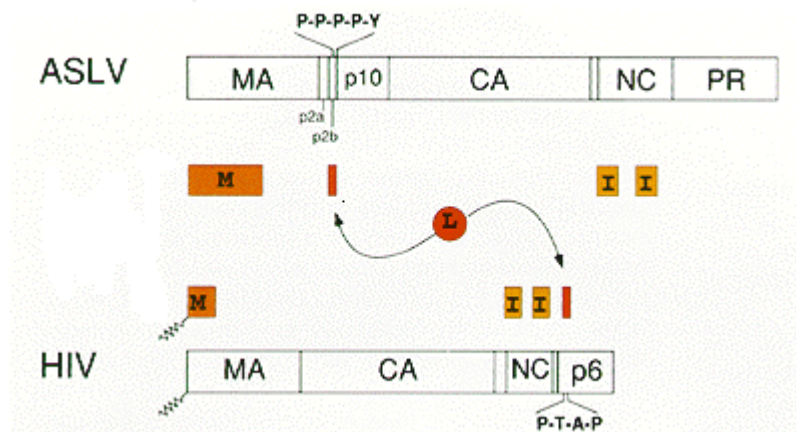
retrovírusových kapsíd, niektoré jeho oblasti by mohli prechodne fungovať v procese tvorby kapsíd a po maturácii by už nemuseli byť potrebné (zhrnuté v Hunter, 1994).

Gag prekurzorové polyproteíny HIV-1 a MPMV nesú na C-konci molekuly peptidové sekvencie označované ako p6, resp. p4 (obr. 7). Prvú správu o funkcii HIV-1 p6^{Gag} priniesol Göttlinger s kolegami (1991), keď zistili, že mutácie v tomto proteíne bránia uvoľňovaniu obalených viriónov z povrchu hostiteľskej bunky. Neskôr bola v p6^{Gag} objavená sekvencia s ústrednou úlohou v neskorých fázach životného cyklu retrovírusov, pri uvoľňovaní vírusových častíc z hostiteľských buniek (Huang et al., 1995; vid' kapitolu 4.3).

Gén *gag* u MPMV (morfogenetický typ D) kóduje 5' proximálne k sekvencii kódujúcej CA proteín proteín s molekulovou hmotnosťou 12kDa (obr 7). Vysoká hladina expresie MPMV génu *gag* s mutovanou sekvenciou kódujúcou p12 nenarušuje tvorbu a uvoľňovanie vírusových častíc, ktoré sú však neinfekčné. Naopak, pri nízkom stupni expresie dochádza k značnému poklesu v tvorbe vírusových častíc z Gag prekurzorov s mutantným p12. Nadexpresia teba prekonáva defekt spôsobený mutovanou p12 doménou (Sommerfelt et al., 1992). Neskôr bola v sekvencii MPMV p12^{Gag} popísaná doména napomáhajúca tvorbe nezrelých vírusových častíc vo vnútri cytoplazmy hostiteľskej bunky (Sakalian a Rapp, 2006; vid' kapitolu 4.4). Ekvivalentné proteíny sú prítomné aj u MMTV, lokalizované medzi MA a CA doménou v Gag prekurzore (obr. 7), ale postrádajú ich retrovírusy typu C. Ich funkcia u MMTV nebola doposiaľ objasnená.

4 Funkčné domény Gag polyproteínu

V Gag polyproteíne boli identifikované tri typy interakcií dôležitých pri zbal'ovaní a pučaní retrovírusov. Domény zodpovedné za tieto interakcie boli pomenované podľa svojich funkcií. Doména M (z angl. membrane binding) sa zúčastňuje smerovania a väzby na membránu, I (z angl. interaction) doména reprezentuje oblasť Gag-Gag interakcií a konečne L (z angl. late) doména zabezpečuje funkcie vyžadované v neskoršej fáze pučania, pri oddeľovaní viriónov od bunky (zhrnuté v Swanstrom a Wills, 1997).



Obr.13. Domény v Gag polyproteíne vírusov vtáčej leukémie a sarkómov (ASLV) a vírusu ľudskej imunodeficiencie (HIV). M doména je esenciálna vo väzbe na membránu, I doména predstavuje hlavnú oblasť Gag-Gag interakcií a L doména sa uplatňuje v neskorých fázach pučania. Zobrazené sú i aminokyselinové zvyšky dôležité pre správnu funkciu L domény. Vlnovka značí myristylový zvyšok. (Prevzaté z Swanstrom a Wills, 1997.)

4.1 M doména

Doména zahrnutá v smerovaní a väzbe Gag molekúl na membránu je lokalizovaná v aminoterminálnej oblasti Gag polyproteínu, konkrétne v MA sekvencii (obr. 13). Prítomnosť zvyšku kyseliny myristilovej na konci *gag* génového produktu retrovírusov sa zúčastňuje interakcie tohto proteínu s bunečnými membránami. Substitúcia alebo delécia glycínu v polohe 2 (Gly2) Gag prekurzorového polyproteínu MLV (Pr65^{gag}) má za následok, že daný proteín nie je myristilovaný. Tým pádom neasociuje s bunečnou membránou a nevytvára vírusové častice (Rein et al., 1986). Rovnako substitúcia Gly2 za alanín u Gag a Gag-Pol prekurzorového polyproteínu pochádzajúceho z HIV-1 (Pr55^{gag}, resp. Pr160^{gag-pol}) dokazuje jeho esenciálnu rolu pri myristilácii. Neprítomnosť myristoylového zvyšku na N-konci týchto proteínov má za následok blokáciu asociácie s bunečnou membránou, akumuláciu *gag* a *gag-pol* génových produktov v cytoplazme buniek, inhibíciu tvorby vírusových častíc a ich uvoľňovanie z bunky (Göttlinger et al., 1989).

Myristilácia Gag polyproteínov retrovírusov je potrebná, ale sama o sebe nepostačujúca pre asociáciu s membránou. Prvých 31 aminokyselinových zvyškov HIV-1 Gag polyproteínu funguje samostatne ako bipartitný signál schopný smerovania na membránu a interakcie s acidickými fosfolipidmi. Pozostáva zo zvyšku kyseliny myristilovej, aminoterminálnych 14 aminokyselín a nasledujúcich 17 aminokyselín, z ktorých sú mnohé bázické. Myristilované Gag polyproteíny u vírusu opičej, resp. mačacej imunodeficiencie (SIV, resp. FIV), Moloneyho línie MLV (Mo-MLV) a MPMV majú taktiež oblasť bázických aminokyselín poblíž

N-konca. U HTLV-1 a vírusu leukémie hovädzieho dobytku (BLV), ktorých Gag polyproteíny sú rovnako myristilované, je však týchto bázických zvyškov relatívne málo. Naopak Gag polyproteíny RSV, EIAV a Visna vírusu nie sú myristilované, ale pri ich N-konci sa nachádza oblasť bázických aminokyselín (Zhou et al., 1994). Ako bolo uvedené v kapitole 5.1, MA proteín HIV-1 vytvára pri kryštalizácii triméry. Trizáciou vzniká veľký, bipartitný povrch, na ktorom sú exponované bázické aminokyselinové zvyšky kooperujúce s N-terminálne naviazaným myristylovým zvyškom pri väzbe na membránu (obr. 8, 9 a 10) (Hill et al., 1996).

Bipartitný, s membránou asociujúci signál lokalizovaný v aminoterminálnej časti Gag polyproteínu je regulovaný v kontexte so zvyškom tohto proteínu. Dobre funguje v kontexte celého HIV-1 Pr55^{gag} ale len slabo v samostatnom maturovanom MA proteíne (p17). Odlišná konformácia samostatného p17 proteínu HIV-1 od MA domény v Pr55^{gag} spôsobuje sekvestráciu zvyšku kyseliny myristilovej. Tým pádom dochádza k strate schopnosti účinne sa viazať na membránu (Zhou a Resh, 1996).

U RSV sa M doména označuje AD1 (z angl. Assembly Domain 1) a je tvorená prvými 85 aminokyselinovými zvyškami MA. Mutácie v AD1 majú za následok redukciu spracovania a akumuláciu intaktných Gag polyproteínov. Z toho vyplýva, že väzba na membránu je prerekvizitou pre aktiváciu PR *in vivo*. Len 30% Gag molekúl mutantných v AD1 asociuje s membránou. Ak je AD1 nahradená 8-aminokyselinovou, membránu viažucou doménou zo Src onkoproteínu, 75% molekúl Gag je asociovaných s membránou (Wills et al., 1991). To poukazuje na aspoň čiastočnú zameniteľnosť retrovírusovej membránu viažúcej domény s nepríbuznou doménou plniacou podobnú funkciu, ktorou je väzba na membránu.

4.2 I doména

Tieto domény lokalizované v NC sekvencii (obr. 13) predstavujú hlavné oblasti vzájomných interakcií okolo 2000 Gag molekúl tvoriacich individuálne vírusové častice a zabezpečujú tvorbu vírusových častíc so správnou vznášavou hustotou (1,16-1,18 g.cm⁻³).

Gag polyproteíny RSV a HIV obsahujú dve malé, interakčné domény prekrývajúce motívy zinkových prstov. Korelácia medzi počtom CCHC motívov a počtom I domén v Gag polyproteíne RSV a HIV by mohla naznačovať istý vzťah medzi nimi. Táto možnosť však bola vyvrátená substitúciou v jedinom CCHC boxe u MLV, ktorá neovplyvnila hustotu viriónov (Gorelick et al., 1988; Bowzard et al., 1998).

U MLV bola popísaná jediná I doména lokalizovaná taktiež v NC sekvencii. Ako primárne funkčné komponenty I domény boli mutačnou analýzou identifikované bázické aminokyselinové zvyšky. Delécia ôsmich, z toho štyroch bázických aminokyselín zablokovala uvoľňovanie viriónov z buniek ako aj proteolytické spracovanie (z angl. processing) prekurzorových polyproteínov (Bowzard et al., 1998).

Podobná situácia nastáva aj u mutantných foriem RSV. V prípade RSV býva I doména označovaná ako AD3 (z angl. assembly domain 3) a v NC sekvencii tohto retrovírusu sa nachádzajú dve jej kópie. Mutanty postrádajúce obe kópie AD3 vykazujú defekt v produkcii vírusových častíc čo dokazuje, že táto oblasť sprostredkováva dôležité Gag-Gag interakcie a je potrebná pri tvorbe kompletných vírusových častíc so správnou hustotou (Bennet et al., 1993; Wills et al., 1994).

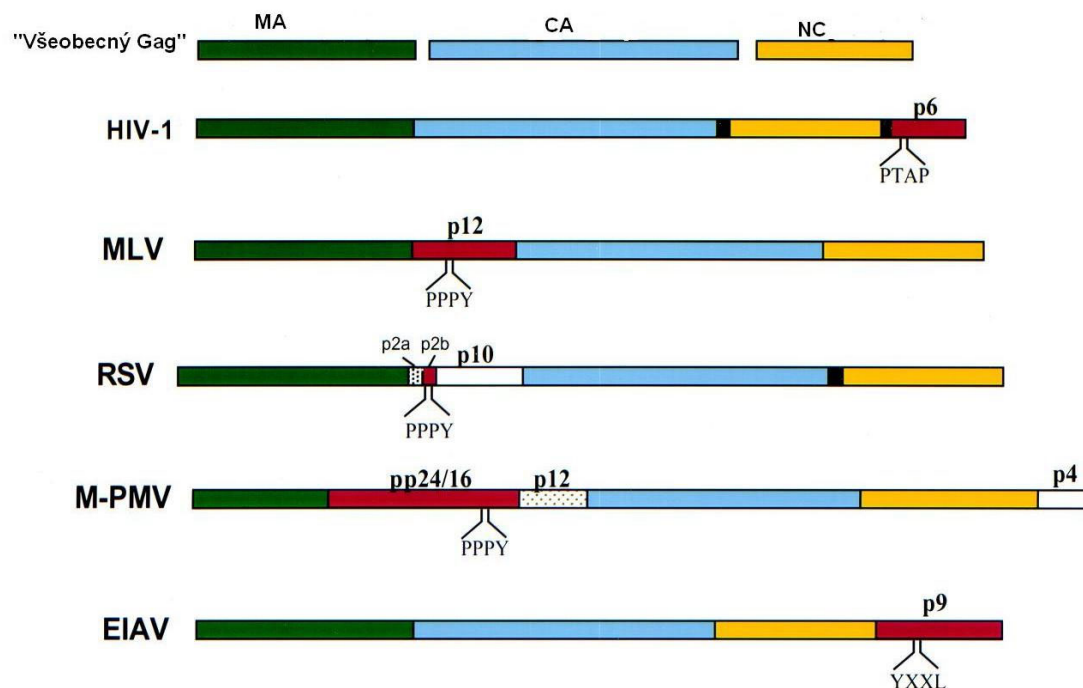
Campbell a Vogt (1995) predpokladali, že ak je RSV AD3 zodpovedná za Gag-Gag interakcie, mali by byť Gag fragmenty obsahujúce AD3 schopné interakcie *in vitro*. Na overenie tejto hypotézy pripravili proteíny zložené z CA-NC domén RSV i CA-NC a CA-NC-p6 HIV-1. Pri vhodnom pH a koncentrácii solí boli všetky tieto proteíny schopné vytvárať útvary javiace sa v elektrónovom mikroskope ako zakryvené plochy a približne guľové častice. Prítomnosť RNA dramaticky zvýšila účinnosť skladania spomínaných proteínových konštruktov do cylindrických častíc, ktorých veľkosť bola úmerná dĺžke molekuly RNA prítomnej v systéme.

Predpokladá sa, že I domény ovplyvňujú hustotu viriónov interakciou s RNA, pričom ju používajú ako lešenie (z angl. scaffold), podporujúc tak následné Gag-Gag interakcie. Na rozdiel od sekvenčne špecifickej interakcie CCHC boxov s ψ enkapsidačným signálom v 5' proximálnej oblasti retrovírusového genómu je pre funkciu I domén charakteristická sekvenčne nezávislá interakcia s RNA (Bowzard et al., 1998).

4.3 L doména

Označenie L je skratkou (z angl.) late, čo znamená neskorý a vyjadruje úlohu týchto domén v neskorej fáze pučania (retro)vírusov. Tieto domény boli nájdené v Gag polyproteínoch retrovírusov (obr. 13 a 14) i v matrixových proteínoch rhabdovírusov a filovírusov. Hrajú hlavnú úlohu pri odškrcovaní vírusových častíc z plazmatickej membrány hostiteľskej bunky. Charakteristickým rysom L domén je vysoko konzervovaný motív sprostredkovávajúci proteín-proteínové interakcie. Boli

identifikované tri triedy L domén: P(T/S)AP, PPxY a YxxL (zhrnuté vo Freed, 2002) resp. YP(x)_nL (zhrnuté v Morita a Sundquist, 2004), interagujúce s hositeľskými faktormi. Tieto domény neboli objavené u IAPs a spumaretrovírusov (zhrnuté vo Freed, 2002; doplnené podľa Morita a Sundquist, 2004). Delécia L domén alebo mutácie v týchto doménach zapríčiňujú blokáciu v neskorom štádiu uvoľňovania (retro)vírusových častíc z buniek.



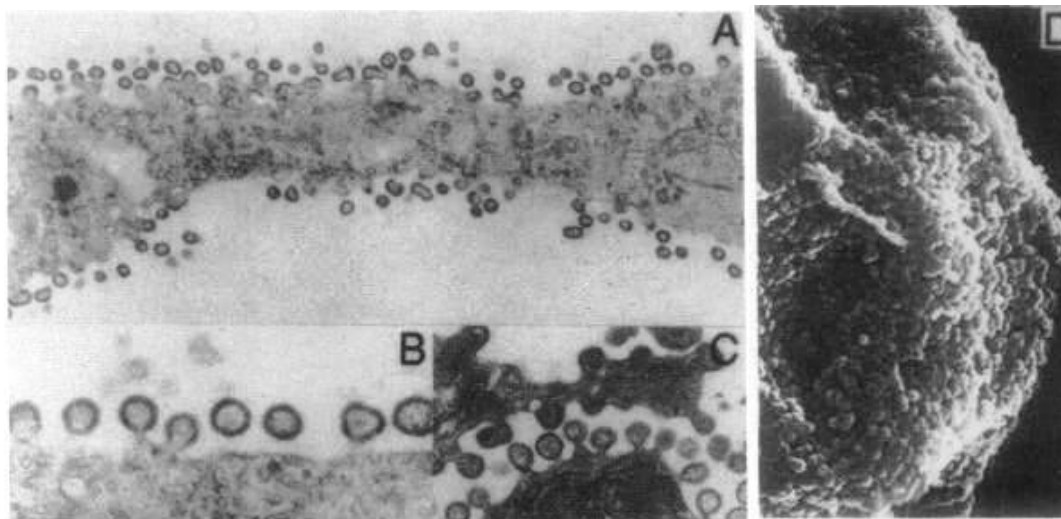
Obr. 14. Lokalizácia L domén v retrovirových Gag polyproteínoch. Proteíny v ktorých sa nachádzajú L domény sú znázornené červeno; MA – matrixový proteín, zeleno; CA – kapsidový proteín, modro; NC – nukleokapsidový proteín, žltó. HIV-1 – vírus ľudskej imunodeficiencie, typ 1; MLV – vírus myšej leukémie; RSV – vírus Rousovho sarkómu; M-PMV – Masonov-Pfizerov opičí vírus; EIAV – vírus konskej infekčnej anémie. (Prevzaté a upravené z Freed, 2002)

4.3.1 HIV-1: prototyp L domény PTAP

Mutačnou analýzou u HIV-1 bol objavený pozoruhodný vírusový fenotyp. V karboxyterminálnom proteíne p6^{gag} boli objavené aminokyselinové sekvencie (obr. 12 a 14) nevyhnutné pri kritickom poslednom kroku pučania vírusových častíc. V neprítomnosti sekvencií v HIV-1 p6^{gag} sa síce vírusové častice zbaľujú na cytoplazmatickej membráne, ale nie sú účinne uvoľňované. Elektrónová mikroskopia odhalila, že sa akumulujú prichytené na povrchu bunky majúcej nematurovanú morfológiu (obr. 15).

Vysoko konzervovaný Pro-Thr-Ala-Pro (PTAP) motív lokalizovaný medzi aminokyselinovými zvyškami 7-10 v p6^{Gag} u HIV-1 je esenciálny pre účinnú produkciu vírusových častíc. Substitúcia všetkých štyroch i jednej zo spomínaných

aminokyselín má za následok dramatické zníženie v počte uvoľnených vírusových častíc, pričom skracovanie p6^{Gag} od C-konca, bez zásahu do PTAP motívu, ani mutácie mimo túto konzervovanú sekvenciu nemajú vplyv na produkciu vírusových častíc (Huang et al., 1995).



Obr. 12. Membránová asociácia p6-mutantných vírusových častíc HIV-1. Transmisný (A-C) a skenovací (D) elektromikrograf COS-7 buniek transfekovaných mutantným provírusom. Zväčšenie: (A) 14800x ; (B) 31900x ; (C) 19500x ; (D) 6600x . (Prevzaté z Göttlínger et al., 1991.)

Ak je polyproteín Gag s mutantným p6 exprimovaný v neprítomnosti ostatných vírusových proteínov, dochádza k účinnej produkcii vírusových častíc. Pozorovanie, že inaktivácia vírusovej proteázy (PR) mutáciou v aktívnom mieste prekonáva defekt spôsobený mutáciou v p6^{Gag} nasvedčuje tomu, že p6^{Gag} nie je potrebný pre produkciu a uvoľňovanie vírusových častíc v neprítomnosti aktívnej PR (Huang et al., 1995).

V COS-7 bunkách (bunečná línia pochádzajúca z opíc, transformovaná vírusom SV40) transfekovaných mutantnou formou HIV-1 so substitúciou dvoch konzervovaných prolínových zvyškov v p6^{Gag} oblasti, rovnako ako v neprítomnosti celej oblasti p6^{Gag}, nebola pozorovaná replikácia vírusu. V Jurkat bunkách (T bunečná línia pochádzajúca od človeka s akútnou T leukémiou) však nebol pozorovaný negatívny dopad spomínanej substitúcie na replikáciu vírusu (Göttlínger et al., 1991). Neskôr sa ukázalo, že klon HIV-1 s mutáciami v PTAP sekvencii v p6^{Gag} doméne nebol schopný produkovať vírusové častice ani z HeLa buniek (bunečná línia odvodená od ľudského cervikálneho karcinómu) ani sa replikovať v T bunečnej línii CEM(12D-7) (Huang et al., 1995; Demirov et al., 2002). Podobný defekt bol pozorovaný v 293T bunkách (ľudské obličkové bunky) i CV-1 bunkách (opíchie obličkové bunky) (Demirov et al., 2002). Toto pozorovanie naznačuje, že

vírusové funkcie potrebné pre uvoľňovanie častíc sa môžu líšiť v rôznych bunčných typoch i keď pri tomto konštatovaní treba mať na pamäti, že popísaná bola jediná bunčná línia v ktorej sa neprejavil spomínaný defekt a navyše sa jedná o transformovanú bunčnú líniu.

4.3.2 RSV: prototyp L domény s PPxY motívom

Sekvencia p2b (obr. 14) unikátna pre RSV Gag obsahuje Pro-Pro-Pro-(Trp/Tyr)-Val [PPP(W/Y)V] motív, umiestnený v blízkosti miesta štiepenia vírusovou PR medzi MA proteínom a susedným p10. U RSV bol tento motív označený ako AD2 (z angl. Assembly Domain 2; ako AD1, resp. AD3 bola u RSV označená M, resp. I doména; vid' kapitola 5.1, resp. 5.2). U retrovírusov s Trp na mieste Tyr je Val konzervovaný a v blízkosti sa nachádza druhý PPPY motív. Valín nie je konzervovaný medzi ostatnými retrovírusmi. Klony s mutáciami v AD2 vykazujú vysoký stupeň proteolytického spracovania ale bez následného uvoľňovania vírusových častíc z hostiteľských buniek. AD2 má preto úlohu v neskorej fáze procesu pučania RSV z hostiteľskej bunky. Genetickou komplementáciou sa zistilo, že funkcia AD2, rovnako ako AD1 i AD3 nie je potrebná na každej Gag molekule v populácii, pretože vo víriónoch so správnou vznášavou hustotou ($1,16-1,18 \text{ g.cm}^{-3}$) boli objavené aj Gag molekuly s defektnými AD. Narozdiel od HIV-1, inaktivácia PR u RSV neprekonáva negatívny vplyv mutácií v AD2 na uvoľňovanie vírusových častíc z povrchu hostiteľskej bunky (Wills et al., 1994).

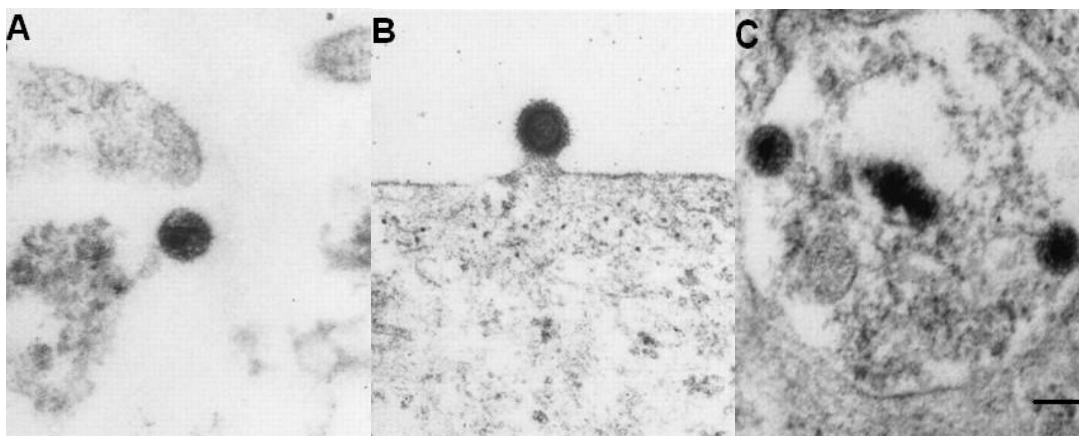
4.3.3 EIAV: prototyp L domény s YxxL motívom

Proteín p9^{Gag} u EIAV (obr. 14) je funkčným homológom proteínov p6^{Gag} u HIV-1 a p2b^{Gag} u RSV a má esenciálnu úlohu v neskorých fázach pučania vírusových častíc z hostiteľských buniek (Parent et al., 1995). V aminokyselinovej sekvencii p9^{Gag} u EIAV bol identifikovaný Tyr-x-x-Leu motív plniaci úlohu L domény. Z 51 aminokyselín tvoriacich EIAV p9^{Gag} je 11 aminokyselín v polohách 10-20, ktoré sú schopné sprostredkovať funkcie potrebné v neskorom štádiu uvoľňovania viriónov. Tieto funkcie môžu byť narušené mutáciou aminokyselinových zvyškov Tyr23, Pro24 a Leu26 (Puffer et al., 1997). HIV-1 motív PTAP, resp. RSV motív PPPY v kontexte p6^{Gag}, resp. p2b^{Gag} sú schopné suplovať funkcie potrebné v neskorej fáze pučania p9^{Gag} deficientného EIAV (Puffer et al., 1997).

4.3.4 MPMV: retrovírus s L doménami PPPY i PSAP

Gén *gag* u MPMV (morfogenetický typ D) kóduje fosfoproteíny pp24 a pp16 (obr. 14), pričom pp16 je C-terminálne lokalizovaný štiepny produkt pp24 obsahujúci Pro-Pro-Pro-Tyr (PPPY) motív. Motív PPPY je postrádateľný pri zbaľovaní kapsíd ale je esenciálny pre uvoľňovanie viriónov z hostiteľských buniek. Mutantným formám MPMV s odstráneným pp16^{Gag} môže byť navrátená schopnosť pučania inzerciou samotného PPPY tetrapeptidu na ľubovoľné miesto v sekvencii Gag. Mutanty s deléciou tohto tetrapeptidu i s bodovou mutáciou ktorejkoľvek zo štyroch aminokyselín tvoriacich tento motív nie sú schopné uvoľnenia z hostiteľskej bunky (obr. 13). Kľúčová rola, ktorú má PPPY motív v neskej fáze pučania retrovírusov typu D, predchádza maturovaníu a je na ňom nezávislá (Yasuda a Hunter, 1998).

V blízkosti PPPY motívu sa u MPMV nachádza ďalší L doménový motív PSAP. Kým mutácia v PPPY doméne kompletne zablokuje uvoľňovanie viriónov (Yasuda a Hunter, 1998), PSAP doména má prídavnú funkciu a vyžaduje intaktnú PPPY doménu (Gottwein et al., 2003).



Obr. 15. Transmisné elektrónové mikrografy ultratenkých rezov COS-1 buniek exprimujúcich divoké a mutantné formy MPMV genómov. (A) Divoký typ; (B) mutant s deléciou PPPY motívu; (C) mutant s deléciou pp16 a zároveň s inzerciou PPPY motívu. Úsečka (panel B) má 100nm. (Prevzaté z Yasuda a Hunter, 1998.)

4.4 Iné funkčné oblasti v molekulách Gag polyproteínu

Rhee a Hunter (1990) popísali zaujímavú mutantnú formu MPMV (označenie R55W), u ktorej stačila jednoaminokyselinová zmena tryptofanu za arginín v polohe 55 v MA proteíne spôsobiť konverziu z morfogenetického typu D na typ C. V bunkách transfekovaných mutantnou R55W formou MPMV genómu boli Gag prekurzorové polyproteíny transportované k plazmatickej membráne, kde prebiehal

proces tvorby vírusových kapsíd súčasne s ich pučaním z bunky. Na základe svojich štúdií dospeli k záveru, že Gag polyproteín retrovírusov vykazujúcich morfogénu typu D obsahuje dominantne fungujúci signál brániaci predčasnému transportu prekursorových molekúl k plazmatickej membráne. Namiesto toho sú prekursorové molekuly smerované a zadržované v určitej oblasti cytoplazmy, kde dochádza k zvýšeniu koncentrácie týchto molekúl na úroveň potrebnú pre samozbaľovanie do nezrelých viriónov. Preto sa zdá, že proces tvorby retrovírusových kapsíd sa líši len v mieste vo vnútri bunky na ktoré sú smerované prekursorové molekuly (Rhee a Hunter, 1990).

Neskôr bola v MA proteíne MPMV identifikovaná oblasť 18 aminokyselín zodpovedná za špecifickú morfogénu typu D a týmito 18 aminokyselinami by mohol byť definovaný nový cicavčí signál pre smerovanie a zadržovanie proteínov v cytoplazme, označovaný skratkou CTRS (z angl. cytoplasmic targeting/retention signal). Táto oblasť je konzervovaná medzi MPMV a MMTV (morfogentický typ B), ale tie aminokyselinové zvyšky v sekvencii MA proteínu Mo-MLV (morfogenetický typ C), ktoré sú ekvivalentné tým v polohe 50-55 v sekvencii MA proteínu MPMV, chýbajú (obr. 16).

```

MPMV 42 PWFPOEGTIDIKRWRRVG 59
      ### # * * ###
MMTV 43 PWFPEEGGLNLQDVKRVG 60
      # # # # #
Mo-MLV 43 PTFNV-G-----WPRDG 53

```

Obr. 16. Porovnanie aminokyselinových sekvencií matrixového proteínu Mason-Pfizerovho opičieho vírusu (MPMV), vírusu tumoru myšej prsnej žľazy (MMTV) a Moloneyho vírusu myšej leukémie (Mo-MLV). Čísla udávajú polohu prvej, resp. poslednej aminokyseliny v zapísanej sekvencii, symbol # značí identickú aminokyselinu, symbol * značí konzervatívnu aminokyselinovú zmenu a pomlčky v zapísanej sekvencii Mo-MLV znamenajú medzery zavedené do sekvencie kvôli maximalizácii homológie medzi zapísanými proteínovými sekvenciami. (Podľa Rhee a Hunter, 1990.)

Sekvencia CTRS v MA proteíne MPMV interaguje kotranslačne s dyneín/dynaktínovým motorovým komplexom a Gag molekuly sú pozdĺž mikrotubúl transportované do pericentriolárnej oblasti cytoplazmy hostiteľskej bunky. V tejto oblasti vznikajú mikrodoény, ktoré sú miestom translácie mRNA i formovania nezrelých vírusových kapsíd (Sfakianos et al., 2003a). Z pericentriolárnej oblasti sú nezrelé vírusové kapsidy transportované k cytoplazmatickej membráne v závislosti na interakcii Gag molekúl s produktmi génu *env*. Exocytotické sekrečné dráhy, ktorých súčasťou sú endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát, však nie sú zahrnuté v tomto procese a nezrelé kapsidy zostávajú v cytoplazme a nedostávajú sa

do vnútrobunecných oddielov. Molekuly Gag interagujú s konzervovaným motívom v cytoplazmatickej časti molekúl Env, ktoré sú transportované dráhami recyklujúcich endozómov. Z toho vyplýva, že transport preformovaných kapsíd z pericentriolárnej oblasti k plazmatickej membráne je podmienený interakciou s molekulami Env a závislý na funkčnom vezikulárnom transporte (Sfakianos a Hunter, 2003b).

5 Triedenie proteínov a formovanie vačkov v MVB

MVBs (z angl. Multivesicular Body) sú časti endozomálneho systému eukaryotických buniek formované invagináciou a pučaním vačkov z limitujúcich membrán endozómov do lumen týchto kompartmentov. Monoubiquitinylácia slúži ako signál smerujúci proteíny do MVB. Formovanie vačkov MVB i triedenie monoubiquitinylovaných proteínov závisí na funkciách skupiny konzervovaných proteínov. Pôvodne bolo u *S. cerevisiae* identifikovaných 18 týchto proteínov nazvaných Vps (z angl. Vacuolar protein sorting) proteíny triedy E. U cicavcov vrátane človeka je známych 25 homológov kvasničných Vps proteínov triedy E. Väčšina Vps proteínov triedy E tvorí tri heteromérické komplexy označované ESCRT-I, ESCRT-II a ESCRT-III (z angl. Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Tieto proteínové komplexy sú prechodne regrutované z cytoplazmy na endozomálnu membránu kde po poradí fungujú pri triedení proteínov a formovaní MVB (zhrnuté v Babst, 2005).

5.1 Ubiquitín

Retrovírusové L domény interagujú s hositeľskou ubiquitinylačnou mašinériou (zhrnuté v Morita a Sundquist, 2004). Ubiquitín (Ub) je proteín pozostávajúci zo 76 aminokyselinových zvyškov. Proces ubiquitinylácie začína kovalentným pripojením Ub k postrannému reťazcu Cys zvyšku Ub-aktivačného enzýmu. Ub-aktivačný enzým sa taktiež označuje E1 a Ub je k nemu viazaný vysoko energetickou thioesterovou väzbou. Následne dochádza k transferu Ub na Ub-konjugačný enzým označovaný E2 alebo UBC (z angl. **u**biquitin conjugating enzyme). Nakoniec je Ub za asistencie Ub ligázy (E3) prenesený na postranný reťazec Lys zvyšku cieľového proteínu. Cicavčie bunky exprimujú početnú rodinu E2 a E3, ktoré sa líšia svojou špecifitou. V bunkách je prítomná aj rodina proteínov zdieľajúca vysoký stupeň sekvenčnej i predikovanej štruktúrnej podobnosti s E2. Členovia tejto rodiny sa nazývajú ako E2-podobné (z angl. E2-like), UBC-podobné (z angl. UBC-like) alebo

UEV (z angl. ubiquitin E2 variant) proteíny. Postrádajú však Cys v katalytickom mieste a preto sú neschopné priamej väzby s Ub. Tieto enzymaticky neaktívne proteíny sa javia ako regulátory modulácie alebo inhibície ubiquitinylačných reakcií. Zatiaľ čo polyubiquitylácia smeruje proteíny k degradácii v 26S proteazóme, monoubiquitylácia slúži ako signál pre internalizáciu proteínov z cytoplazmatickej membrány alebo ako signál smerujúci proteíny do endocytotických alebo biosyntetických dráh v MVB/naskorých endozómov (zhrnuté vo Freed, 2002).

5.2 HRS komplex

Prvým komplexom triedy E rozpoznávajúcim ubiquitinylované proteíny je komplex HRS, ktorý je homológom kvasničného Vps27. HRS je rozpustný proteín regrutovaný na membránu raných endozómov interakciou s fosfatidylinositol-3-fosfátom cez svoju FYVE doménu. HRS komplex regrutuje ESCRT-I komplex priamou interakciou ESCRT-I s HRS a TSG101 (Tumour Susceptibility Gene) (zhrnuté v Morita a Sundquist, 2004; Babst, 2005). HRS obsahuje dva s ubiquitínom interagujúce motívy (UIM) viažuce ubiquitinylované proteíny a je dôležitý pre triedenie proteínov do MVB. HRS funguje ako adaptorová molekula viažuca monoubiquitinylované proteíny a ESCRT-I. Interakciou s klatrínovým plášťom endozómov potom koncentruje a lokalizuje proteíny do MVB (zhrnuté v Babst, 2005).

5.3 ESCRT-I

ESCRT-I je komplex troch proteínov: TSG101 (kvasničný homológ Vps23/Stp22), VPS28 a VPS37 A-D (kvasničné homológy označované Vps). ESCRT-I slúži v endozómoch ako triediaci receptor rozpoznávajúci monoubiquitinylované proteíny určené pre roztriedenie do MVB. Ubiquitylácia TSG101 má za následok disociáciu tejto podjednotky ESCRT-I od membrány a preto má negatívnu regulačnú funkciu (zhrnuté v Babst, 2005).

5.4 ESCRT-II

Ďalším komplexom regrutovaným na miesto biogenézy MVB je ESCRT-II pozostávajúci z VPS22, VPS25 a VPS36 (zhrnuté v Babst, 2005) alternatívne označovaných EAP45, EAP30 a EAP20 (zhrnuté v Morita a Sundquist, 2004). VPS36 obsahuje tzv. NZF doménu viažúcu ubiquitín. Väzba ubiquitínu je esenciálna

pre funkciu ESCRT-II. Interakcia ESCRT-I i ESCRT-II s ubiquitinylovanými proteínmi neslúži len pri triedení proteínov ale má aj regulačnú úlohu pri aktivácii nasledujúcich dejov, ako je formovanie ESCRT-III (zhrnuté v Babst, 2005). Zatiaľ však nebola zistená priama súvislosť ESCRT-II s pučaním (retro)vírusov (Morita a Sundquist, 2004).

5.5 ESCRT-III

Tento komplex pozostáva so vzájomne homologických podjednotiek so silne bázičným N-koncom, silne kyslým C-koncom a predikovanou centrálnou oblasťou s konformáciou zvinutej šróbovice (z angl. coiled-coil). Šesť kvasničných podjednotiek ESCRT-III má u človeka desať ortológov označovaných ako CHMP proteíny. Desať CHMP proteínov sa rozdeľuje do šiestich skupín homologických s kvasničnými proteínmi. Týchto šesť skupín sa ďalej rozdeľuje na tri podskupiny: CHMP4/6, CHMP2/3 a CHMP1/5. Subkomplex CHMP4/6 je regrutovaný na endozomálnu membránu priamou interakciou CHMP6 s ESCRT-II. Proteín CHMP4 viaže ďalší proteín triedy E: AIP1/Alix (kvasničný ortológ Bro1/Vps31). CHMP2/3 subkomplex je regrutovaný subkomplexom CHMP4/6, pričom CHMP3 viaže fosfatidylinositol-5-fosfát. Kvasničné ortológy CHMP1 a CHMP5 (Did2 resp. Vps60) majú regulačnú funkciu. Negatívne dominantné mutanty väčšiny CHMP proteínov sú potenciálnymi inhibítormi uvoľňovania HIV a EIAV z buniek. To naznačuje, že tieto proteíny sa svojimi funkciami zúčastňujú pučania retrovírusov (zhrnuté v Morita a Sunquist, 2004).

5.6 AIP1/Alix

Ludský ortológ kvasničného proteínu Bro1 je ďalší proteín triedy E interagujúci cez svoj PTAP element s TSG101 a CHMP4 triedou ESCRT-III proteínov. AIP1/Alix pomáha kontrolovať formovanie včkov pučiacich dovnútra MVB. Je možné že má dôležitú úlohu pri generovaní záhybov membrány. Tento proteín je väzbovým partnerom pre L domény triedy YP(x)_nL. To naznačuje, že (retro)vírusy môžu vstupovať do mašinérie MVB dráh priamou interakciou s proteínom AIP1/Alix (zhrnuté v Morita a Sunquist, 2004). Proteín Bro1 v kvasničných bunkách regrutuje deubiquitinačný enzým Doa4. Enzým Doa4 odstraňuje ubiquitín z označených proteínov. Bro1/ALIX taktiež interaguje s ESCRT-I a Vps4 a môže slúžiť ako spojovník medzi rôznymi ESCRT. Na dôvažok proteín Bro1 prechodne interaguje

najprv s ESCRT-I, potom s ESCRT-III, na záver s Vps4 a to presne v tomto poradí (zhrnuté v Babst, 2005).

5.7 Proteíny VPS4

Tieto multiméne ATPázy triedy AAA sú jedinými proteínmi triedy E s enzymatickou aktivitou. Po dokončení triedenia proteínov v MVB sa viažu na ESCRT-III a za spotreby ATP rozkladajú tento komplex. V cicavčích bunkách sa nachádzajú dva Vps4 paralógy: VPS4A a VPS4B/Skd1, vykazujúce 80% vzájomnej sekvenčnej identity a 59 resp. 60% identity s kvasničným ortológom. Mutantné formy VPS4 neschopné väzby alebo hydrolyzy ATP inhibujú triedenie proteínov v MVB. V prítomnosti týchto mutant zostávajú všetky ostatné proteíny triedy E prichytené k limitujúcim membránam kompartmentov triedy E.

6 Interakcie L domén s bunecnými proteínmi

(Retro)vírusové L domény fungujú v interakcii s hostiteľskými faktormi pri uvoľňovaní viriónov cez plazmatickú membránu hostiteľskej bunky v procese pučania. L domény sú malé, obsahujú motívy zúčastňujúce sa proteín-proteínových interakcií medzi bunecnými proteínmi a v niektorých prípadoch fungujú i po prenose z jedného vírusu do druhého a aj po umiestnení do neprirodzenej pozície v Gag polyproteíne (zhrnuté vo Freed, 2002).

6.1 L doména P(T/S)AP interaguje s TSG101

Proteín TSG101 (tumor susceptibility gene 101) (obr. 17) je bunecným proteínom napomáhajúcim triedeniu proteínov do MVB (vid' kapitolu 5.2). Patrí do rodiny proteínov s enzymaticky neaktívnou E2 doménou. V N-terminálnej časti molekuly sa nachádza tzv. UEV (z angl. ubiquitin enzyme 2 variant) doména vykazujúca štruktúrnu podobnosť s ubiquitin E2 ligázami (vid' kapitolu 5.1). Táto doména je schopná viazať ubiquitín (Ub) ale stráda cysteínový zvyšok v aktívnom mieste, ktorý je potrebný k enzýmovému prenosu Ub (zhrnuté v Morita a Sunquist, 2004; Freed, 2002).

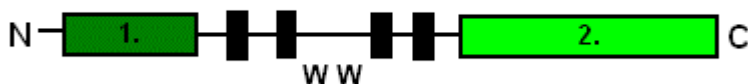


Obr. 17. Schématická organizácia molekuly TSG101. N-koniec, (1.) UEV doména, (2.) oblasť zvinutej šróbovice (z angl. coiled-coil), (3.) C-koncová oblasť a C-koniec molekuly. Medzi (1.) a (2.) sa nachádza oblasť bohatá na prolín. (Podľa Freed, 2002.)

P(T/S)AP L doména vyskytujúca sa napr. v HIV-1 p6^{Gag} (Göttlinger et al., 1991; Huang et al., 1995) alebo v MPMV pp24^{Gag}/pp16^{Gag} (Gottwein et al., 2003) interaguje s TSG101 (Garrus et al., 2001). V dvojhybridovom systéme bolo preukázané, že ľudský TSG101 viaže HIV-1 p6^{Gag} a bodovými mutáciami v PTAP motíve sa zisťovalo, či interakcia s TSG101 vyžaduje neporušenú L doménu. Výsledky potvrdili špecifickú väzbovú interakciu PTAP motívu s TSG101 (Garrus et al., 2001). Garrus so spolupracovníkmi (2001) ďalej zisťovali, ktorá časť molekuly TSG101 interaguje s PTAP motívom v HIV-1 p6^{Gag}. V dvojhybridovom systéme sa ukázalo, že HIV-1 p6^{Gag} sa viaže do N-terminálnej časti TSG101 (aminokyselinové zvyšky 1-207) obsahujúcej UEV doménu. Na základe toho pripravili rekombinantný proteín TSG101 s UEV doménou (tvorený aminokyselinovými zvyškami 1-145), pomocou ktorého popísali interakciu HIV-1 p6^{Gag} s touto časťou molekuly TSG101 *in vitro*.

6.2 L doména PPxY interaguje s Nedd4

Nedd4 (z angl. neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4) a Nedd4 podobné proteíny tvoria početnú rodinu E3 Ub-ligáz (viď kapitolu 5.1). Tieto proteíny majú spoločné tri domény (obr. 18): (i) N-terminálnu väzucu lipidy (C2), (ii) tzv. WW (W značí tryptofan moduly prítomné vo viacerých kópiách a (ii) C-terminálnu tzv. Hect doménu (z angl. homologous to E6-associated protein C-terminus) s Ub-ligázovou aktivitou.



Obr. 18. Schématická organizácia molekuly Nedd4. N-koniec, (1.) C2 doméne, WW moduly s tryptofánovými zvyškami, (2.) Hect doména a C-koniec. (Podľa Freed, 2002.)

Kikonyogo so spolupracovníkmi (2001) vyslovila hypotézu, podľa ktorej môžu rozdiely v sekvencii troch doteraz popísaných L domén (zhrnuté vo Freed, 2002)

nasvedčovať dvom možnostiam: (i) každá L doména využíva inú dráhu v procese pučania retrovírusov, alebo (ii) každá L doména viaže odlišné komponenty jedinej dráhy. Pre overenie tejto hypotézy pripravili peptidy pozostávajúce z troch tandemových repetícií 11-aminokyselinovej p2b sekvencie obsiahnutej v RSV Gag polyproteíne. Tie použili pri vyhľadávaní interakčných partnerov v kuracej cDNA expresnej knižnici. Objavili tak dva klony kódujúce členov Nedd4 rodiny E3 Ub-ligáz, ktoré pomenovali LDI-1 a LDI-2 (z angl. late domain-interacting protein 1 a 2) Aby zistili, nakoľko je interakcia špecifická, testovali *in vitro* mutantné formy RSV L domén s aminokyselinovými substitúciami v PPxY motíve. Tieto mutanty neinteragovali s LDI-1 ani s LDI-2. Navyše zistili, že LDI-1 a LDI-2 neinteragujú *in vitro* s peptidovými sondami odvodenými od HIV p6 a EIAV p9 (Kikonyogo et al., 2001).

6.3 L doména YP(x)_nL interaguje s AIP1/ALIX

Proteín AIP1/ALIX má dôležitú úlohu nielen v bunčných endozomálnych dráhach (viď kapitolu 5.6) ale i v dynamike cytoskeletu, pri apoptóze a v regulácii JNK signálnej dráhy (zhrnuté vo Fisher et al., 2007).



Obr. 19. Schématická organizácia molekuly ľudského ALIX. N-koniec, (1.) Bro1 doména, (2.) V doména, (3.) PRR oblasť bohatá na prolín, C-koniec. (Podľa Fisher et al., 2007)

Molekula AIP1/ALIX viaže p9^{Gag} doménu EIAV i p6^{Gag} oblasť HIV-1 obsahujúce L doménový motív (Strack et al., 2003). V HIV-1 štruktúrnom proteíne p6^{Gag} sa okrem ₇PTAP₁₀ motívu s primárnou L doménovou funkciou nachádza i sekvencia ₃₆YPLASL₄₁ a tieto fungujú v tandeme (Fisher et al., 2007). Molekula ľudského proteínu ALIX je rozdelená do troch domén (obr. 19): Bro1 doména (aminokyselinové zvyšky 1-358), centrálna „V“ doména (aminokyselinové zvyšky 362-702) a oblasť bohatá na prolín (PRR, z angl. proline-rich region; aminokyselinové zvyšky 703-868). Bro1 doména má svoj analóg v kvasničnom proteíne Bro1p, je usporiadaná okolo centrálnej repetície a interaguje s proteínom CHMP4 (viď kapitolu 5.5), centrálna V doména je tvorená dvomi rozsiahlymi ramenami vzájomne usporiadanými do tvaru písmena V a oblasť PRR interaguje

s proteínom TSG101. Centrálna V doména interaguje s retrovírusovými Gag molekulami obsahujúcimi YP(x)_nL motív pravdepodobne cez vysoko konzervovaný hydrofóbny žliabok lokalizovaný na jednom z ramien tvoriacich túto doménu. Zatiaľ čo u EIAV mutácie v YPDL motíve výrazne znižujú uvoľňovanie vírusových častíc z hostiteľských buniek, u HIV-1 nemajú taký dramatický vplyv ako mutácie v primárnom L doménovom PTAP motíve (Fisher et al., 2007).

6.4 Úloha proteazómov pri pučaní retrovírusov

Na počiatku výskumov zaoberajúcich sa úlohou ubiquitínu (Ub) (viď kapitolu 5.1) pri zbaľovaní a pučaní retrovírusu bolo objavenie voľných molekúl Ub v časticiach vírusu Rousovho sarkómu (Putterman et al., 1990). Títo autori vylúčili inkorporáciu Ub do viriónov v závislosti na Env polyproteínovom prekurzore i možnosť, že molekuly Ub sa dostávajú do viriónov pripojené na molekuly Gag polyproteínu. Neskôr sa však ukázalo, že u HIV-1 a SIV je Ub kovalentne pripojený k molekulám p6^{Gag} a u Mo-MLV k molekulám p12^{Gag} (Ott et al., 1998). Prvým retrovírusom u ktorého bola popísaná súvislosť medzi inhibíciou proteazómov a redukciou spracovania Gag polyproteínov, zníženou schopnosťou pučania, maturácie a infekivity bol HIV-1 a HIV-2. Analýza elektrónovou mikroskopiou odhalila defekt v poslednom štádiu uvoľňovania viriónov z hostiteľských buniek podobný tomu s mutáciou v L doméne lokalizovanej u HIV-1 v p6^{Gag} (viď kapitolu 4.3.1) (Schubert et al., 2000). Ďalším retrovírusom u ktorého bol popísaný negatívny vplyv inhibítorov proteazómov na uvoľňovanie z hostiteľských buniek je RSV. Tento efekt môže byť preklenutý nadprodukciou Ub v hostiteľských bunkách alebo priamou fúziou molekuly Ub na karboxylový koniec Gag molekuly (Patnaik et al., 2000).

Komplexnú prácu o požiadavkách rôznych druhov retrovírusov na funkcie proteazómov priniesol Ott so spolupracovníkmi (2003). Zhrnuli v nej poznatky o interakcii retrovírusových L domén s ubiquitinačným systémom a preskúmali MLV, MPMV a MMTV vo vzťahu k ubiquitinačnému systému. Tieto tri retrovírusy sa od tých čo boli dovtedy prekúmané v súvislosti s ubiquitinylačným systémom líšia v organizácii Gag molekúl (obr. 6), L domén (obr. 11) a miestom skladania viriónov. Výsledkom boli zistenia, že inhibícia proteazómov hostiteľských buniek má negatívny vplyv na pučanie MLV (morfogenetický typ C, L doména PPPY) i MPMV (morfogenetický typ D, L doména PPPY). Pučanie MMTV (morfogenetický typ B, neznáma L doména) nebolo inhibítormi proteazómov výrazne ovplyvnené.

K podobnému záveru dospel výskum EIAV (morfogenetický typ C, L doména YPDL) (Ott et al., 2002).

7 Záver

Retrovírusy boli dlhšiu dobu skúmané nielen ako významné patologické agens živočíchov vrátane človeka, ale so svojou jedinečnou biológiou sa stali systémom používaným pri štúdiu mnohých aspektov vírusovej replikácie a pomohli odhaliť nejednu neznámu v biológii hostiteľských buniek. V uplynulom čase si získali nezastúpiteľné miesto pri skúmaní dejov súvisiacich s uvoľňovaním nelytických, obalených vírusov z buniek. Retrovírusy sú schopné uzurpovať a presmerovať bunečné funkcie normálne súvisiace s triedením proteínov a formovaním membránou obalených vnútrobunecných vačkov. Preto je kapitola venovaná týmto bunečným procesom a proteínom, ktoré sú v nich angažované, neoddeliteľnou súčasťou tejto rešeršnej práce. V úvode stručne uvádzam čitateľa do problematiky retrovírusov a následne ho oboznamujem s morfológiou a morfogenezou retrovírusových častíc. Tieto informácie sú podstatné pre pochopenie užších súvislostí. Práca pokračuje prehľadom o štruktúre proteínov tvoriacich retrovírusové častice a na ňu nadväzuje pojednanie o funkciách spojených so štruktúrnymi proteínmi retrovírusov. Podrobnejšie sa venujem tzv. L doménam (z angl. late, neskorý), ktoré majú podstatnú a nezastúpiteľnú úlohu v kritických posledných krokoch uvoľňovania vírusových častíc z hostiteľských buniek. Toto zhrnutie najvýznamnejších štúdií venujúcich sa zbaľovaniu retrovírusových častíc a ich uvoľňovaniu z buniek má poslúžiť ako teoretický základ pre diplomovú prácu zameranú na štúdium prototypického zástupcu betaretrovírusov, vírus tumoru myšej prsnej žľazy (MMTV). Okrem matrixového, kapsidového a nukleokapsidového proteínu sú v Gag polyproteínovom prekurzore MMTV obsiahnuté proteínové sekvencie s neznámou funkciou a rovnako nebol doposiaľ u MMTV popísaný motív s L doménovou funkciou. Zdanlivé nedostatky vo výskume MMTV boli spôsobené problematickým klonovaním tohto vírusu. V našom laboratóriu máme v súčasnosti k dispozícii bunečnú líniu stabilne transfekovanú MMTV a venujeme sa objasňovaniu neznámych v procese zbaľovania a pučania MMTV.

8 Zoznam použitých skratiek

AD - domény podstatné pre zbaľovanie retrovírusov (z angl. assembly domain)
Ala - alanín
ALV - vírus vtácej leukémie (z angl. avian leukosis virus)
AMV - vírus vtácej myeloblastózy (z angl. avian myeloblastosis virus)
ASLV - vírusy sarkómov a leukémie vtákov (z angl. avian sarcoma/leucosis viruses)
ASV - vírus vtáčích sarkómov
BLV vírus leukémie hovädzieho dobytku (z angl. bovine leukemia virus)
CA kapsidový proteín
CTD - karboxyterminálna doména (z angl. C-terminal domain)
CypA - cyklofilín A
Cys - cysteín
DNA - deoxyribonukleová kyselina
dsDNA - dvojvláknová
dut - retrovírusový gén kódujúci dUTPázu
dUTPáza / DU - deoxyutidín trifosfatáza
GDP - guanozín difosfát
EIAV - vírus konskej infekčnej anémie (z angl. equine infectious anemia virus)
env - retrovírusový gén kódujúci obalové proteíny
Env - obalové proteíny (z angl. envelope)
FIV - vírus mačacej imunodeficiencie (z angl. feline immunodeficiency virus)
gag - retrovírusový gén kódujúci štruktúrne proteíny
Gag - štruktúrny polyproteín (a angl. group specific antigen)
GDP - guanozín difosfát
Gly - glycín
HFV - ľudský penový vírus (z angl. human foamy virus)
His - histidín
HIV - vírus ľudskej imunodeficiencie (z angl. human immunodeficiency virus)
HTLV - vírus ľudskej T leukémie (z angl. human T leukemia virus)
IAP - vnútrociernové častice typu A (z angl. intracisternal type A particles)
IN - integráza
kb - kilobáza (10^3 báz)
LTR - dlhé koncové repetície (z angl. long terminal repeats)
Lys - lyzín
RNA - ribonukleová kyselina
MA - matrixový proteín
Met - metionín
MHR - oblasť významnej homologie (z angl. major homology region)
MLV - vírus myšej leukémie (z angl. murine leukemia virus)
MMTV - vírus tumoru myšej prsnej žľazy (z angl. mouse mammary tumor virus)
Mo-MLV - Moloneyho línia vírusu myšej leukémie
MPMV - Mason-Pfizerov opičí vírus (z angl. Mason-Pfizer monkey virus)
mRNA - mediátorová RNA
MVB - mnohovačkové teliesko (z angl. multivesicular body)
NC - nukleokapsidový proteín (z angl. nucleocapsid)
nm - nanometer (10^{-9} metra)
NTD - aminoterminálna doména (z angl. N-terminal domain)
PBS - primer viažuce miesto (z angl. primer binding site)
PM - plazmaticá membrána
pol - retrovírusový gén kódujúci reverznú transkriptázu a integrázu

Pol - polyproteín so sekvenciou reverznej transkriptázy a integrázy
PR - proteáza
pro - retrovírusový gén kódujúci proteázu
Pro - prolín
R - repetícia
RER - drsné endoplazmatické retikulum
RNA - ribonukleová kyselina
RNáza - ribonukleáza
RSV - vírus Rousovho sarkómu (z angl. Rous sarcoma virus)
RT - reverzná transkriptáza
SDS-PAGE - polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátom sodným
Ser - serín
SIV - vírus opičej imunodeficiencie (z angl. simian immunodeficiency virus)
ssRNA - jednovláknová ribonukleová kyselina
SU - povrchový proteín (z angl. surface)
Thr - treonín
Trp - tryptofan
Tyr - tyrozín
TM - transmembránový proteín
tRNA - transférová ribonukleová kyselina
U3 resp. U5 - unikátna sekvencia na 3' resp. 5' konci
Ub - ubiquitín
UBC - ubiquitín konjugačný enzým (z angl. ubiquitin conjugating enzyme)
Val - valín
VLPs - vírusom podobné častice (z angl. virus-like particles)
WDSV - vírus Walley dermálneho sarkómu (z angl. Walley dermal sarcoma virus)

9 Použitá literatura

- Babst, M. (2005): A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**:2-9.
- Baltimore, D. (1971): Expression of animal virus genomes. *Bacteriol.Rev.* **35**:235-241.
- Bennett, R. P., Nelle, T. D., Wills, J. W. (1993): Functional chimeras of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J.Virol.* **67**:6487-6498.
- Bess J. W. Jr., Powell, P. J., Issaq, H. J., Schumack, L. J., Grimes, M. K., Henderson, L. E., Arthur, L.O. (1992): Tightly bound zinc in human immunodeficiency virus type 1, human T-cell leukemia virus type 1, and other retroviruses. *J. Virol.* **66**: 840-847.
- Bowzard, J. B., Bennett, R. P., Krishna, L. K., Ernst, S. M., Rein, A., Wills, J. V. (1998): Importance of basic residues in the nucleocapsid sequence for retrovirus Gag assembly and complementation rescue. *J.Virol.* **72**(11):9034-9044.
- Choi, G., Park, S., Choi, B., Hong, S., Lee, J., Hunter, E., Rhee, S. S. (1999): Identification of a cytoplasmic targeting/retention signal in a retroviral Gag polyprotein. *J.Virol.* **73**(7):5431-5437.
- Conte, M. R., Klikova, M., Hunter, E., Ruml, T., Matthews, S. (1997): The three-dimensional solution structure of the matrix protein from the type D retrovirus, the Mason-Pfizer monkey virus, and the implications for the morphology of retroviral assembly. *EMBO J.* **16**(19):5819-5826.
- Demirov, D. G., Orenstein, J. M., Freed, E. O. (2002): The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **76**(1):105-117.
- Fisher, R. D., Chung, H.-Y., Zhai, Q., Robinson H., Sundquist, W. I., Hill, C. P. (2007): Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* **128**:841-852.
- Freed, E. O. (2002): Viral late domains. *J.Virol.* **76**(10):4679-4687.
- Gamble, T. R., Vajdos, F. F., Yoo, S., Worthylake, D., K., Housewart, M., Sundquist, W. I., Hill, C. P. (1996): Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* **87**:1285-1294.
- Gambille, T. R., Yoo, S., Vajdos, F. F., Schwedler, von, U. K., Worthylake, D. K., Wang, H., McCutcheon, J. P., Sundquist, W. I., Hill, C. P. (1997): Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **278**:849-853.
- Garrus, J. E., Schwedler, von, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Côte, M., Rich, R. L., Myszka, D. G.,

Sundquist, W. I. (2001): Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107:55-65.

Gorelick, R. J., Henderson, L. E., Hanser, J. P., Rein, A. (1988): Point mutation of Moloney murine leukemia virus that fail to package viral RNA: evidence for specific RNA recognition by a "zinc finger-like" protein sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8420-8424.

Göttlinger, H. G., Sodroski, J. G., Haseltine, W. A. (1989): Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(15):5781-5.

Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G., Haseltine, W. A. (1991): Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3195-3199.

Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A., Freed, E. O. (1995): p6^{Gag} is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clone expressing protease. *J. Virol.* 69(11):6810-6818.

Henderson, L. E., Krutzsch, H. C., Oroszlan, S. (1983): Myristyl amino terminal acylation of murine retrovirus proteins: An unusual post translational protein modification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 339-443.

Hill, C. P., Worthylake, D., Bancroft, D. P., Christensen, A. M., Sundquist, W. I. (1996): Crystal structures of trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane associations and assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(7):3099-3104.

Huebner, R. J., Armstrong, D., Okuyan, M., Sarma, P. S., Turner, H. C. (1964): Specific complement-fixing viral antigens in hamster and guinea pig tumors induced by the Schmidt-Rupin strain of avian sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51(50):742-750.

Hung, P. P., Robinson, H. L., Robinson, W. S. (1971): Isolation and characterization of proteins from Rous sarcoma virus. *Virology* 43(1):251-266.

Hunter, E. (1994): Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Semin. Virol.* 5:71-83.

Jamjoom, G., Karstin, W. L., Naso, R. B., Arcement, L. J., Arlinghans, R. B. (1974): Proteins of Rauscher murine leukemia virus: Resolution of a 70,000 dalton, nonglycosylated polypeptide containing p30 peptide sequences. *Virology* 68(1):135-145.

Kuff, E. L., Lauders, K. K. (1988): The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects. *Adv. Cancer Res.* 51:183-276.

Leis, J., Baltimore D., Bishop, J. M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S. P., Oroszlan, S., Robinson, H., Skalka, A. M., Temin, H. M., Vogt, V. M. (1988): Standardized and

simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J. Virol.* **62**:1808-1890.

Morita, E., Sundquist, W. I. (2004): Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **20**:395-425.

Nydegger, S., Foti, M., Derdowski, A., Spearman, P., Thali, M. (2003): HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* **4**:902-910.

Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O., Henderson, L. E. (1998): Ubiquitin is covalently attached to the p6^{Gag} protein of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12^{Gag} protein of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* **72**(4):2962-2968.

Parent, L. J., Bennett, R. P., Craven, R. C., Nelle, T. D., Krishna, N. K., Bowzard, J. B., Wilson, C. B., Puffer, B. A., Montelaro, B. A., Wills, J. W. (1995): Positionally independent and exchangeable late budding function of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J. Virol.* **69**:5455-5460.

Patnaik, A., Chau, V., Wills, J. W. (2000): Ubiquitin is a part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(24):13069-13074.

Pepinsky, R. B., Vogt, V. M. (1979): Identification of retrovirus matrix proteins by lipid-protein crosslinking. *J. Mol. Biol.* **131**: 819-839.

Pepinsky, R. B., Vogt, V. M. (1984): Fine structure analyses of lipid-protein and protein-protein interactions of gag protein p19 of avian sarcoma and leukemia viruses by cyanogen bromide mapping. *J. Virol.* **52**: 145-153.

Puffer, B. A., Parent, L. J., Wills, J. W., Montelaro, J. C. (1997): Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J. Virol.* **71**(9):6541-6546.

Putterman, D., Pepinsky, R. B., Vogt, V. M. (1990): Ubiquitin in avian leukosis virus particles. *Virology* **176**(2):633-637.

Rein, A., McClure, M. R., Rice, N. R., Luftig, R. B., Schultz, A. M. (1986): Myristylation site in Pr65gag is essential for virus particle formation by Moloney murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**(19):7246-7250.

Rhee, S. S., Hunter, E. (1990): A single amino acid substitution within the matrix protein of a type D retrovirus converts its morphogenesis to that of a type C retrovirus. *Cell* **63**:77-86.

Rocquigny, de, H., Gabus, C., Vincent, A., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B. P., Darlix, J.-L. (1992): Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:6472-6476.

Sakalian, M., Rapp, N. D. (2006): Rescue of internal scaffold-deleted Mason-Pfizer monkey virus particle production by plasma membrane targeting. *Virology* 345:317-327.

Schubert, U., Ott, D. E., Chertova E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich H. G., Yewddel, J. W. (2000): Proteasome inhibition interferes with Gag polyprotein processing, release and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(24):13057-13062.

Schultz, A. M., Oroszlan, S. (1983): In vivo modification of retroviral gag gene-encoded polyproteins by myristic acid. *J. Virol.* 46: 355-361.

Sfakianos, J. N., LaCasse, R. A., Hunter, E. (2003a): The MPMV cytoplasmic targeting-retention signal directs nascent Gag polypeptides to a pericentriolar region of the cell. *Traffic* 4:660-670.

Sfakianos, J. N., Hunter, E. (2003b): MPMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome. *Traffic* 4:671-680.

Sommerfelt, M. A., Rhee, S. S., Hunter, E. (1992): Importance of p12 protein in Mason-Pfizer monkey virus assembly and infectivity. *J. Virol.* 66(12):7005-7011.

South, T. L., Summers, M. F. (1993): Zinc- and sequence dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein: NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC. *Prot. Sci.* 2:3-19.

Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., Gottlinger, H.G. (2003): AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114(6):689-699.

Swanstrom R., Wills, J. W. (1997): Synthesis, assembly, and processing of viral proteins, p. 263-334. In Coffin, J. M., Hughes S. H., Varmus, H. E. (ed.), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1997), pp. 263-334.

Vogt, V.M., Eisenman, R. (1973): Identification of a large polypeptide precursor of avian oncornavirus proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70(6):1734-1738.

Vogt, V. (1997): Retroviral virions and genomes, p. 27-70. In Coffin, J. M., Hughes, S. H., Varmus, H. E. (ed.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.

Wills, J. V., Craven, R. C., Weldon, R. A. Jr., Nelle, T. D., Erdie, C. R. (1991): Suppression of retroviral MA deletions by the aminoterminal membrane-binding domain of p60^{src}. *J. Virol.* 65:3804-3812.

Wills, J. V., Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P., Leis, J. (1994): An assembly domain of the Rous sarcoma virus Gag protein required late in budding. *J. Virol.* 68(10):6605-6618.

Yasuda, J., Hunter, E. (1998): A proline-rich motif (PPPY) in the Gag polyprotein of Mason-Pfizer monkey virus plays a maturation-independent role in virion release. *J. Virol.* **72**(5):4095-4103.

[0]Zhou, W., Parent, L. J., Wills, J. W., Resh, M. D. (1994): Identification of a membrane binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* **68**(4):2556-2569.

Zhou, W., Resh, M. D. (1996): Differential membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J. Virol.* **70**(12):8540-8548.